

A Exposição Única ao Contaminante Ambiental Tributilestanho induz Disfunção Endotelial e Estresse Oxidativo em Aorta

Gersica de Almeida Correia Santos

**Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, 2018.

A Exposição Única ao Contaminante Ambiental Tributilestanho induz Disfunção Endotelial e Estresse Oxidativo em Aorta

Gersica de Almeida Correia Santos

**Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória-ES, 2018.

A Exposição Única ao Contaminante Ambiental Tributilestanho induz Disfunção Endotelial e Estresse Oxidativo em Aorta

Gersica de Almeida Correia Santos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em X/X/2018 por:

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon – Orientadora, UFES

Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior – Co-Orientador, UFES

Prof^a. Dr^a. Livia Carla de Melo Rodrigues, UFES

Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade, UVV

Coordenadora do PPGCF Prof^a. Dr^a. Sonia Alves Gouvea- UFES

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, 2018

Santos, Gersica de Almeida Correia Santos 1992

A Exposição Única ao Contaminante Ambiental Tributilestanho induz Disfunção Endotelial e Estresse Oxidativo em Aorta [Vitória] 2018
74 p., 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon

Co-Orientador: Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

1. Espécies Reativas de Oxigênio 2. Tributilestanho 3. Reatividade Vascular 4. Músculo Liso Vascular 5. Endotélio Vascular 6. Aorta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre guiar meu caminho. Foi uma jornada de dificuldades e conquistas, que me fez aprender, e entender um pouco os planos de Deus para a vida.

A minha família pelo o apoio, carinho que proporcionaram e pelo incentivo a nunca desistir dos nossos sonhos, e principalmente aos meus pais Gilvan e Ana Cristina por toda a paciência, e por tudo o que fizeram e contribuíram para eu conseguir enfrentar os desafios da vida. E ao meu irmão Gerson, que mesmo em meios as brigas me incentivou a buscar novos desafios e conquistas, me motivando para o crescimento profissional e pessoal.

À querida professora e orientadora Ivanita Stefanon, muito obrigada por todos os ensinamentos, apoio e incentivo, por sempre estar disponível para tirar as dúvidas, discutir resultados, puxar a orelha nos momentos necessários, pelos agradáveis caronas de volta para casa, pelos longos anos de acolhimento no laboratório, por todos os bons momentos que vivenciei. Hoje sei que você foi, e é muito mais que um exemplo de orientadora, devo muito do crescimento pessoal e profissional que alcancei, por isso tenho um imenso carinho e admiração.

Ao professor Jones Bernardes Graceli, cuja linha de pesquisa originou este trabalho, no qual sua ajuda me incentivaram a buscar novos conhecimentos, direcionando-me para diversas perspectivas futuras. Muito obrigada também a toda equipe do laboratório dele por sempre me receber gentil e prontamente.

Ao Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior, por me inspirar a ser esse exemplo de pesquisador, dedicado a pesquisa e sempre receptivo a ajudar e co-orientar para melhorar esse trabalho, direcionando-me pelos melhores caminhos.

À professora Alessandra por abrir as portas do LEMC para mim, por me incentivar a pesquisa, por todas as oportunidades, ensinamentos e sabedoria que me inspiraram a buscar a pesquisa científica.

Ao professor Dalton Valentim Vassallo, no qual tenho uma grande admiração, e ao professor Leonardo, que estavam sempre dispostos para solucionar minhas dúvidas, a ajudar nas mais diversas formas. Vocês me incentivam sendo brilhantes professores, pesquisadores e pessoas.

Aos meus queridos amigos, estes a família que escolhi, por estarem presentes em momentos importantes da minha vida, nunca me deixar desanimar e incentivar a ser uma pessoa e profissional melhor, em especial a Jéssica S Spalenza pelo carinho, pelas horas de estudos, pela força e incentivo. A Marcos Leal, pelos conselhos pessoais e científicos, por me incentivar à pesquisa, me ajudar na compreensão de alguns dados, solucionar sempre minhas dúvidas. Aos amigos que sempre rezavam, por mim. Aos que participavam do meu crescimento e amadurecimento pessoal e

profissional, aguentavam minhas reclamações e me ajudaram com os mais variados conselhos, Renato, Gabriel, Amanda, Victor, Daniel, Maira, a vocês dedico um grande carinho e admiração. Além disso, obrigada em especial a aqueles amigos que renovam minhas forças a cada encontro, entre eles: Marcos, Iuri Thaynah, Bruna, Stéfano, André, Fernando, Lucas, Victória, Lucão, Priscila e Rafael, e todos os outros que torceram pelo meu sucesso.

A Cleydianne Vieira por me apoiar nessa linha de pesquisa, a dividir projetos, alunos, sempre dispostos a ajudar e dar sugestão. Aos alunos de iniciação, em especial ao André Moreira, pelo tratamento dos animais e por toda a ajuda oferecida. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

A todos os colegas e amigos do LEMC, que ajudaram de forma direta ou indiretamente para minha formação, seja através de do incentivo, dos momentos de análise estatística e resultados, da ajuda com os protocolos, conselhos ou momentos de boa companhia dentro do laboratório. Em especial gostaria de agradecer ao Marito Silva e ao João Vitor, por me a estudar para provas ou mesmo me questionar sobre resultados e experimento, me fazendo entender um pouco sobre o universo científico. A Tati e Samya, por me ajudarem e ensinarem a aorta, sem vocês esse trabalho não seria possível. A todas as pessoas que compartilharam a aorta comigo, Thiago, Evylin, Rakel e Tati, obrigada pela ajuda, pelas horas de experimentos agradáveis e pelos fármacos compartilhados. Também não posso me esquecer de todas as pessoas que já passaram pelo LEMC e contribuíram para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos demais alunos e pesquisadores, de outros laboratórios desse programa de pós-graduação, que contribuíram como meu desenvolvimento profissional, de maneira direta ou indireta, em especial aquelas pessoas que realizaram alguma disciplina comigo, ou estavam sempre dispostos a ajudar/solucionar alguma dúvida, ou mesmo compartilhar uma agradável conversa, em especial agradeço a todos os pesquisadores do laboratório da professora Nazaré, a companhia de vocês em congressos e conversas diversas foi essencial.

A todos os funcionários do programa, que sempre me receberam muito bem, tornando muitas vezes possíveis o trabalho dentro do programa de pós-graduação, vocês são profissionais exemplares. Agradeço em especial a Cíntia, como toda a ajuda na secretária, nos momentos de auxílio a manutenção do laboratório. Ao LHMI, em especial a Danielle e Mário, por toda ajuda no criostato e fotomicroscópio, pela conversa e companhia, vocês foram de grande importância para a conclusão desse trabalho, muito obrigada.

A Universidade Federal do Espírito Santo, que me proporcionou a construção do conhecimento acadêmico, conhecer e fazer parte desse programa de pós-graduação em Ciências fisiológicas e a CAPES pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de Mestrado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Utilização dos compostos organoestânicos.....	21
1.2 Degradação do Tributilestanho.....	22
1.3 Tintas anti-incrustantes à base de compostos organoestânicos	22
1.4 Toxicidade dos compostos organoestânicos	24
1.5 Fontes de exposição humana	24
1.6 Contaminação ambiental aos compostos organoestânicos	25
1.7 Distribuição e toxicidade do Tributilestanho.....	27
1.8 Efeitos vasculares do Tributilestanho	28
1.9 Regulação da reatividade vascular	29
1.9.1 Músculo liso vascular	29
1.9.2 Endotélio vascular	30
1.9.3 Fatores relaxantes e constritores derivados do endotélio	31
1.9.4 Angiotensina II e produção de espécies reativas de oxigênio	32
1.10 Hipótese	32
2. OBJETIVO GERAL.	33
2.1 Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Animais experimentais	34
3.1.1 Grupos experimentais	34
3.2 Protocolos experimentais	34
3.2.1 Preparação dos anéis de aorta	34

3.2.2 Obtenção dos registros para estudo da reatividade vascular em anéis de aorta	35
3.2.3 Avaliação funcional dos anéis isolados de aorta	36
3.2.4 Avaliação da participação endotelial	37
3.2.5 Avaliação da resposta vasoconstritora a fenilefrina	38
3.2.6 Avaliação dos fatores endoteliais envolvidos na resposta vasoconstritora a fenilefrina	38
3.2.6.1 Influência da via do óxido nítrico sobre a resposta contrátil a fenilefrina	38
3.2.6.2 Influência das espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre a resposta contrátil a fenilefrina	38
3.2.6.3 Influência angiotensina II sobre a resposta contrátil a fenilefrina	38
3.2.7 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente endotélio	39
3.3 Quantificação da produção do ânion superóxido (O_2^-)	39
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5. FARMÁCOS E REAGENTES UTILIZADOS	42
6. RESULTADOS	43
6.1 Efeito de uma dose de Tributilestanho sobre a resposta ao Cloreto de Potássio (KCl) nos anéis isolados de aorta de ratas	43
6.2 Efeitos de uma dose de Tributilestanho sobre a reatividade vascular à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratas	43
6.3 Efeitos de uma dose de Tributilestanho sobre a participação do endotélio na reatividade vascular à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratas	45
6.4 Efeitos do óxido nítrico (NO) sobre a reatividade vascular à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratas tratadas com uma dose de Tributilestanho	46
6.5 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos anéis isolados de aorta	48
6.5.1 Efeito da administração de Apocinina, um inibidor da NADPH oxidase	48

6.5.2 Efeito da administração do Tiron, um varredor de ânion superóxido (O^{2-})	50
6.5.3 Efeito da administração da Catalase, um varredor de peróxido de hidrogênio H_2O_2	52
6.6 Efeito de uma dose de Tributilestanho na regulação do sistema renina-angiotensina	53
6.7 Efeito de uma dose de tributilestanho na resposta vasodilatadora dependente do endotélio	58
6.8 Quantificação da produção de Espécies reativas de oxigênio (EROs) através da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE)	59
7. DISCUSSÃO	60
8. CONCLUSÃO	66
9 REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de Tributilestanho (ng/g \pm desvio padrão relativo) para estações analisadas ao longo da costa de Vitória, sudeste do Brasil	27
Tabela 2: Valores de resposta máxima (R _{máx} , %) e sensibilidade (pD ₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratas dos grupos Controle (CT) e Tributilestanho (TBT).....	44
Tabela 3: Valores de resposta máxima (R _{máx} , % da contração ao KCl) e sensibilidade (pD ₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratas Wistar dos grupos Controle com endotélio (CT E+), Controle sem endotélio (CT E-), Tributilestanho com endotélio (TBT E+) e Tributilestanho sem endotélio (TBT E-).....	46
Tabela 4: Valores de resposta máxima (R _{máx} , %) e sensibilidade (EC ₅₀) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratas Wistar do grupo Controle (CT) e Controle L-NAME (CT L-NAME), Tributilestanho (TBT) e Tributilestanho L-NAME (TBT L-NAME).....	48
Tabela 5: Valores de resposta máxima (R _{máx}) e sensibilidade (pD ₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratas Wistar dos grupos Controle (CT), Controle Apocinina (CT APO), Controle Tiron (CT TIRON), Controle Catalase (CT CAT), Controle Losartan (CT LOS), Tributilestanho (TBT), Tributilestanho Apocinina (TBT APO), Tributilestanho Tiron (TBT TIRON), Tributilestanho Catalase (TBT CAT) e Tributilestanho Losartan (TBT LOS).....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fontes de exposição humana aos compostos organoestânicos	25
Figura 2: Concentrações mais altas de butilestanho (Sn ng/g dw) detectadas em sedimentos superficiais da América do Sul em comparação com outras determinações mundiais.....	26
Figura 3: Resumo das principais ações do TBT no endotélio e na célula muscular lisa.....	32
Figura 4: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm.....	35
Figura 5: a) Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems. b) Deflexão positiva indicando uma contração do anel vascular e abaixo, uma deflexão negativa, indicando o relaxamento do anel vascular.....	36
Figura 6: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio.....	37
Figura 7: Avaliação das respostas dos anéis de aorta ao KCl 75 mM em ratas dos grupos Controle (CT, n=10) e Tributilestanho (TBT, n=10).....	43
Figura 8: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Tributilestano (TBT, n=6).....	44
Figura 9: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Controle sem endotélio (CT E-, n=7)e resposta máxima a fenilefrina (R _{máx}). b) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestanho	

(TBT, n=6), Tributilestano sem endotélio (TBT E-, n=5) e resposta máxima a fenilefrina (R_{máx})..... 45

Figura 10: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT,n=9) e Controle L-NAME (CT L-NAME,n=6). b) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestano (TBT, n=6) e Tributilestano L-NAME (TBT L-NAME, n=6)..... 47

Figura 11: Representação gráfica da diferença do percentual da área abaixo da curva (dAUC%) entre os grupos Controle e Controle L-NAME (CT, n=6) vs Tributilestano e Tributilestano L-NAME (TBT, n=6)..... 48

Figura 12: a) Curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Controle Apocinina (CT APO, n=5) e resposta máxima a fenilefrina (R_{máx}). b) Curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestano (TBT, n=6) e Tributilestano Apocinina (TBT APO, n=6) e resposta máxima a fenilefrina (R_{máx})..... 49

Figura 13: Representação gráfica da diferença do percentual de área abaixo da curva (dUAC %) entre o grupo Controle e Controle APO (n=5) vs Tributilestano e Tributilestano APO (n=6)..... 50

Figura 14: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Controle Tiron (CT TIRON, n=7) e resposta máxima a fenilefrina (R_{máx}). b) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestano (TBT, n=6) e Tributilestano Tiron (TBT TIRON, n=6) e resposta máxima a fenilefrina (R_{máx})....51

Figura 15: Representação gráfica da diferença do percentual de área abaixo da curva (dAUC %) entre os grupos Controle e Controle TIRON (n=7) vs Tributilestano e Tributilestano TIRON (n=6)..... 51

Figura 16: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Controle Catalase (CT CAT n=5) e resposta máxima a fenilefrina (R_{máx}). b) Curvas concentração-resposta à fenilefrina

em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestanho (TBT, n=6) e Tributilestanho Catalase (TBT CAT, n=8).....	52
Figura 17: Representação gráfica da diferença do percentual de área abaixo da curva (dAUC %) entre o grupo Controle e Controle Catalase (n=5) vs Tributilestanho e Tributilestanho Catalase (n=6).....	53
Figura 18: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Controle Losartan (CT LOS, n=6) e resposta máxima a fenilefrina (R _{máx}). b) Curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestanho (TBT, n=6) e Tributilestanho Losartan (TBT L-NAME, n=7) e resposta máxima a fenilefrina (R _{máx}).....	54
Figura 19: Representação gráfica da diferença do percentual de área abaixo da curva (dAUC%) entre o grupo Controle e Controle Losartan (n=6) vs Tributilestanho e Tributilestanho Losartan (n=6).....	55
Figura 20: a) Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle (CT, n=8) e Tributilestanho (TBT, n=8). b) Resposta máxima (R _{máx}). c) Sensibilidade (pD ₂), no qual representa 50 % da contração máxima.....	58
Figura 21: Avaliação da intensidade de fluorescência da produção de ânion superóxido (O ²⁻), pela técnica do dihidroetídio (DHE) na aorta dos grupos: Controle (CT); Controle Fenilefrina (CT FE); Tributilestanho (TBT); Tributilestanho Fenilefrina (TBT FE); Tributilestanho Tiron (TBT TIRON); Tributilestanho Losartan (TBT LOS);Tributilestanho Apocinina (TBT APO); Tributilestanho Catalase (TBT CAT).....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ACh – Acetilcolina

ATP – Adenosina Trifosfato

Angio II - Angiotensina II

ANOVA – Análise de variância

Apo - Apocinina

Ca²⁺ – Íon cálcio

CAT - Catalase

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CEUA-UFES -Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo

CT– Controle

cGMP – Monofosfato cíclico de guanosina

CMLVs – Células do músculo liso vascular

dAUC – Diferença da área sob a curva

DBT – Dibutilestanho

DHE–Dihidroetídio

E+ – Endotélio íntegro

E- – Endotélio removido mecanicamente

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EDHF – Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EPM – Erro Padrão da Média

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FE – Fenilefrina

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HOCl⁻ – Ácido hipocloroso

IP – Intraperitoneal

KCl - Cloreto de Potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio Monobásico

L-NAME – NG-nitro-L-arginina metil éster

LOS - Losartan

M –Molar

μG – Microgramas

ng– Nanogramas

μM – Micrômetros

MAPK – Proteína - quinases ativadas por mitógenos

MBT – Monobutilestano

MLV – Músculo Liso Vascular

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

NaCl –Cloreto de Sódio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NPS – Nitroprussiato de Sódio

O^{2-} – Ânion superóxido

OH^{\cdot} – Radical Hidroxila

OTBT – Óxido de tributilestanho

OTs – Compostos organoestânicos

pD₂ – Log da concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo à fenilefrina

PGH₂ – Prostaciclina

PGF_{2α} – Prostaglandinas

PVC – Cloreto de Polivinila

R_{máx} – Resposta máxima

Sn – Estanho

TBT – Tributilestanho

TXA₂ – Tromboxano A₂

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os organoestanhos como o tributilestano (TBT) são contaminantes ambientais com efeito citotóxico. Animais expostos cronicamente ao TBT apresentam disfunção da reatividade vascular associada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de uma única exposição ao TBT. A reatividade vascular de anéis isolados de aorta de ratas foi avaliada 24 horas após a exposição a uma dose única de TBT (500 ng/kg) por gavagem. **METODOLOGIA:** Ratas Wistar (240-260 g) foram divididas nos grupos controle (CT), e expostas a dose única de TBT. A aorta foi isolada e cortada em anéis, que foram imersos em solução de Krebs submetidos à curva concentração resposta da fenilefrina (FE), L-N^G-nitroarginina metil ester (L-NAME), Apocinina, Tiron e Losartan. A resposta vasodilatadora foi avaliada através do relaxamento de doses crescentes de Acetilcolina (ACh). Além disso, foi medida a presença de EROs através da intensidade da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE). Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados por ANOVA 2 vias ou teste t não pareado com significância de $p < 0,05$. Os devidos protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal UFES (Protocolos 27/2016). **RESULTADOS:** Os anéis de aorta do grupo TBT apresentaram redução da sensibilidade (pD_2) e da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) a ACh (pD_2 TBT: $6,37 \pm 0,27^*$ vs CT: $7,3 \pm 0,25$; $R_{m\acute{a}x}$ TBT: $77 \pm 5,18^*$ vs CT: $92,9 \pm 1,88^*$; $*p < 0,05$ vs CT), e aumento da resposta máxima e da sensibilidade a FE ($R_{m\acute{a}x}$: TBT: $142 \pm 7,2^{**}$ vs CT: $110 \pm 4\%$ KCl, $** p < 0,01$; pD_2 : TBT: $7,68 \pm 0,08^*$ vs CT: $7,19 \pm 0,13 \%$ KCl, $*p < 0,05$ vs CT). A incubação dos anéis de aorta com L-NAME aumentou a reatividade a FE em ambos os grupos ($R_{m\acute{a}x}$ TBT: $142,2 \pm 7,2$ vs TBT L-NAME: $175 \pm 7,8^\#$ e CT: 110 ± 4 vs CT L-NAME: $165,7 \pm 8,6^{**}$ % KCl, $^\# p < 0,05$ vs TBT; $** p < 0,01$ vs CT). Entretanto, a área abaixo da curva (dAUC %) foi menor no grupo TBT vs CT (CT: $52,4 \pm 4,61$ vs TBT: $35,8 \pm 4,31^* p < 0,05$). A resposta máxima a FE foi reduzida no grupo TBT após incubação com Apocinina, Tiron, Catalase e Losartan (TBT: $142 \pm 7,2$ vs TBT APO: $102,9 \pm 5,42^\#^\#$; TBT TIRON: $104,3 \pm 9,3^\#^\#$; TBT Catalase: $89,16 \pm 9,65^\#^\#$; TBT LOS: $101,8 \pm 7,38^\#^\# \%$ KCl; $^\#^\# p < 0,01$ vs TBT). A aorta dos animais expostos ao TBT apresentaram aumento de EROs. **CONCLUSÃO:** Concluimos que 24 h após a exposição a uma única dose de TBT 500 ng/kg, causa disfunção endotelial, aumento da resposta

vasoconstrictora a fenilefrina e redução da resposta vasodilatadora a acetilcolina que parece ser mediada pelo estresse oxidativo vascular.

Palavras-Chave: Espécies Reativas de Oxigênio, Tributilestanho, Endotélio Vascular, Reatividade Vascular, Aorta.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Organotins such as tributyltin (TBT) are environmental contaminants with a cytotoxic effect. Animals chronically exposed to TBT have vascular reactivity dysfunction associated with increased production of reactive oxygen species (ROS). The aim of this study was to investigate the effect of a single exposure to TBT. Vascular reactivity of isolated female rat aorta rings was evaluated 24 hours after exposure to a single dose of TBT (500 ng / kg) per gavage. **METHOD:** Wistar rats (240-260 g) were divided into control (CT) groups, and exposed to a single dose of TBT. The aorta was isolated and cut into rings, which were immersed in Krebs solution submitted to the concentration response curve of phenylephrine, L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME), Apocynine, Tiron and Losartan. The vasodilatory response was assessed by relaxing the increasing doses of Acetylcholine (ACh). In addition, the presence of ROS was measured by the intensity of the fluorescence produced by the oxidation of the dihydroetide (DHE). Data were expressed as mean \pm SEM and analyzed by 2-way ANOVA or unpaired t-test with significance of $p < 0.05$. The protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation UFES (Protocols 27/2016). **RESULTS:** The aortic rings from the TBT group showed reduction of sensitivity (pD_2) and the maximum response (R_{max}) to ACh (pD_2 TBT: $6.37 \pm 0.27^*$ vs CT: 7.3 ± 0.25 ; R_{max} TBT: $77 \pm 5,18^*$ vs. CT: $92.9 \pm 1.88^*$, $^* p < 0.05$ vs CT), and increased maximal response and phenilefrine sensitivity (R_{max} : TBT: $142 \pm 7.2^{**}$ vs CT : $110 \pm 4\%$ KCl, $^{**} p < 0.01$; pD_2 : TBT: $7.68 \pm 0.08^*$ vs. CT: $7.19 \pm 0.13\%$ KCl, $^* p < 0.05$ vs. CT). A incubation of the aortic rings with L-NAME increased the reactivity to phenilefrine in both groups (R_{max} TBT: 142.2 ± 7.2 vs TBT L-NAME: $175 \pm 7.8^\#$ and CT: 110 ± 4 vs. CT L-NAME: $165, 7 \pm 8.6^{**}\%$ KCl, $^\# p < 0.05$ vs TBT, $^{**} p < 0.01$ vs CT). However, the area under the curve (dAUC %) was lower in the TBT vs CT group (CT: 52.4 ± 4.61 vs TBT: $35.8 \pm 4.31^* p < 0.05$). The maximum response to phenilefrine was reduced in the TBT group after incubation with Apocinin, Tiron, Catalase and Losartan (TBT: 142 ± 7.2 vs TBT APO: $102.9 \pm 5.42^{##}$ TBT TIRON: 104.3 ± 9 , TBT: $101.8 \pm 7.38\%$ KCl; $^{##} p < 0.01$ vs TBT). ROS was increased in the aorta of the animals exposed to TBT. **CONCLUSION:** We conclude that 24 hours after exposure to a single dose of

500 ng / kg TBT causes endothelial dysfunction, increase in the vasoconstrictor response to phenylephrine and a reduction in the vasodilatory response to acetylcholine that appears to be mediated by vascular oxidative stress.

Keywords: Reactive Oxygen Species, Tributyltin, Vascular Endothelium, Vascular Reactivity, Aorta.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Utilização dos compostos organoestânicos

Os compostos organoestânicos (OTs) são classificados como mono-, di-, tri- ou tetra organoestânicos (SNOEIJ; PENNINKS; SEINEN, 1987), são líquidos incolores ou de cor amarela; lipofílicos; solúveis em etanol, heptano, benzeno e tolueno (STAREK, 2009). Dentre os OTs que apresentam maior atividade biológica e, conseqüentemente aplicação comercial, são os triorganoestânicos. Esses compostos são utilizados como conservantes de madeira, estabilizadores de cloreto de polivinila (PVC), fungicidas e biocidas (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003; CAO et.al., 2009; NENG; SANTALLA; NOGUEIRA, 2014). Os Tributilestanhos (TBT) são utilizados em: biocidas (particularmente lesmas), em redes de pesca, nas tintas anti-incrustantes e em desinfetantes hospitalares, o uso como aditivos para tecidos de algodão, papel, e tintas utilizadas em habitações; o arrefecimento em sistemas de centrais elétricas e de fábricas de celulose, de papel, de cerveja, e de curtumes (BARNES; STORNER, 1959; SNOEIJ; PENNINKS; SEINEN, 1987). Entretanto, o principal uso do TBT é como biocida em tintas anti-incrustante para embarcações (OGATA et. al, 2001; OMAE, 2006).

O TBT possui elevada atividade tóxica contra fungos e bactérias, sendo eficaz principalmente contra bactérias Gram-positivas. Devido ao alto potencial tóxico para os peixes e fitoplâncton, seu uso irregular na agricultura e o excesso de aplicações marítimas estão relacionados à contaminações ambientais importantes (NICKLIN; ROBSON, 1998).

O TBT também é considerado um desregulador endócrino capaz de inibir a aromatase. Sua exposição em ratas grávidas promove redução do ganho de peso materno, aumento no número de abortos após implante do embrião e diminuição do peso fetal. Além disso, ocorre também a redução dos níveis séricos de tiroxina e triiodotironina (ADEEKO et.al., 2003). Agentes causadores de desregulação endócrina como o TBT, podem promover disfunção mitocondrial que prejudica as reservas e os níveis de ATP. Também são capazes de gerar prejuízo na produção e

secreção de alguns hormônios, dentre eles o que regulam o apetite, e isso pode induzir obesidade (RAJAMANI et. al., 2017).

1.2. Degradação do Tributilestanho

A degradação do TBT ocorre por meio de processos bióticos e abióticos, ocasionando a perda progressiva do grupo butil ligado ao átomo de estanho e, assim, resultando nos seus derivados dibutilestanho (DBT) e monobutilestanho (MBT) até o estanho (Sn^{4+}) ($\text{TBT} \rightarrow \text{TBT}^+ \rightarrow \text{DBT}^{2+} \rightarrow \text{MBT}^{3+} \rightarrow \text{Sn}^{4+}$). (HOCH, 2001; GADD, 2000).

Ao comparar alguns organoestânicos o TBT apresenta uma menor fração de degradação (HOCH, 2001). A principal forma de degradação abiótica do TBT é a fotólise, e a biótica é por micro-organismos como: fungos, algas e bactérias (ALZIEU, 2000; OMAE, 2006; HOCH, 2001).

1.3. Tintas anti-incrustantes à base de compostos organoestânicos

Os organoestanhos podem chegar ao ambiente por meio de diversas utilizações industriais e agrícolas (HOCH, 2001; GADD, 2000). Uma das principais utilizações do TBT é em tintas anti-incrustantes, pois os cascos das embarcações imersas no mar, independentemente do período, estão sujeitas à incrustação de crustáceos e algas. Tal ocorrência leva à redução da eficiência operacional e, conseqüentemente, do aumento nos custos, principalmente devido ao aumento no consumo de combustível pelas embarcações. Uma incrustação de 10 μm no casco pode desencadear o aumento de 0,3 a 1% no consumo de combustível. Para isso, uma forma de reduzir a adesão é a utilização de tintas anti-incrustantes (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003).

Essas tintas podem ser de diferentes tipos; as que possuem maior duração são as copolímeros, no qual liberam o biocida a uma taxa sempre constante. Sua proteção contra a incrustação pode durar de 5 a 7 anos devido a taxa de liberação da tinta copolímera ser mais lenta (HOCH, 2001).

No início dos anos 80, foram encontradas conchas anormalmente finas de ostras que se encontravam em águas contaminadas com os agentes anti-incrustantes. Então a partir desse período surgiram vários estudos demonstrando os efeitos tóxicos desses compostos organoestânicos (OTs) (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003; GODOI et.al., 2003b). Com isso foram realizados monitoramentos ambientais, identificando-se o TBT como o principal responsável pelo desenvolvimento de caracteres masculinos em fêmeas de diversas espécies de gastrópodes, sendo esse fenômeno conhecido como imposex (ALZIEU, 2000). O grau de desenvolvimento do imposex também está relacionado aos níveis de contaminação pelo TBT, os quais são maiores próximos de portos e marinas, onde as embarcações atracam (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003)

Devido à toxicidade do TBT e suas implicações em organismos marinhos, a Organização Marítima Internacional (OMI), aprovou a Resolução A.895(21) que proíbe o uso de organoestânicos nos navios (incluindo plataformas fixas e flutuantes e unidades de armazenamento) e que foi adotada em 2001. Entretanto, no Brasil, o termo foi assinado em 13 de novembro de 2002, que só entrou em vigor em novembro de 2007 - NORMAM-23/DPC (2007). Essas normas são aplicadas tanto em embarcações brasileiras quanto em embarcações estrangeiras que atracarem no Brasil. Elas visam estabelecer procedimentos para controlar o uso de anti-incrustantes prejudiciais ao meio ambiente ou à saúde humana (BRASIL, 2007).

Apesar de haver legislação, a falta de fiscalização é um dos obstáculos para se controlar a contaminação do ambiente pelos OTs. Nos Estados Unidos (EUA), em 2014, ainda existiam indústrias comercializando e vendendo tintas a base de TBT. (TBT-based antifouling paints remain on sale; Correspondence/Marine Pollution Bulletin, 2014).

1.4. Toxicidade dos compostos organoestânicos

A toxicidade dos OTs está relacionada com a quantidade de Sn presente, essa aumenta com a adição de Sn, e possui máxima toxicidade em compostos com três radicais, como o TBT (GUI-BIN; QUN- FANG; BIN, 2000).

A toxicidade dos OTs está relacionada a diversos fatores, dentre eles: o tempo de meia vida ($T_{1/2}$) e a sua biodisponibilidade, que em ambiente aquático podem variar de seis dias até algumas semanas. Além disso, alguns fatores ambientais como o pH, a temperatura, a turbidez e a luminosidade interferem nessa toxicidade (SARRADIN et. al., 1995). No mar, o $T_{1/2}$ é de aproximadamente 17 dias na temperatura de 28°C; já os sedimentos contendo o TBT possuem maior $T_{1/2}$, variando de dois anos até várias décadas (DE CARVALHO OLIVEIRA et al., 2010).

Os triorganoestânicos são adsorvidos como partículas de suspensão, devido sua baixa solubilidade e mobilidade em ambientes aquáticos, onde se encontram associados aos sedimentos de argila e são tóxicos mesmo em baixas concentrações (HOCH, 2001). A maior parte do TBT presente na água está ligado a essas partículas, enquanto que o restante está ligado à matéria orgânica dissolvida e à ligantes orgânicos e inorgânicos (DOS SANTOS, 2008). Quando as concentrações de TBT estão muito elevadas, a sua degradação biológica pode ser inibida, devido à elevada toxicidade para esses organismos (MARTINS; VARGAS, 2013).

1.5. Fontes de exposição humana

Para os seres humanos, existem principalmente duas formas de contaminação pelos TBT, sendo estas: a contaminação pelo consumo de alimentos, através da dieta, e a exposição indireta por algum produto contendo tais substâncias, como demonstrado na figura 1 (HOCH, 2001). A contaminação dos peixes é principalmente devido aos sedimentos e água contaminada por tintas anti-incrustantes. Já os produtos agrícolas (vegetais, batatas, açúcar), pela contaminação com agrotóxicos e pesticidas (CAO et.al., 2009).

A absorção do TBT pelo trato gastrointestinal varia de 20 a 50 % (dependendo do veículo), porém através da pele, dos mamíferos, reduz para cerca de 10 % (WHO, 1999).

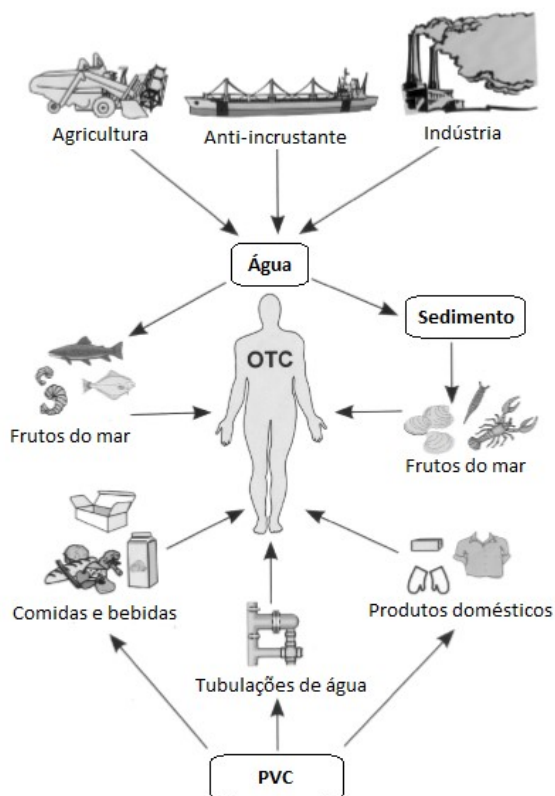


Figura 1: Fontes de exposição humana aos compostos organoestênicos. HOCH, 2001.

1.6. Contaminação ambiental

A concentração de TBT encontrado nos peixes depende da capacidade de acumulação desses compostos em cada espécie, conseqüentemente o consumo desses peixes contaminados pode representar um risco à saúde (LEE; HSIEH; TIEN, 2006). Os animais marinhos que mais acumulam TBT são os moluscos bivalves (CAO et.al., 2009).

OTs são encontrados nos sedimentos de diversos continentes, como na América do Sul, América do Norte, Europa e Ásia (CASTRO; PERINA; FILLMANN, 2012). Na América do Sul, as maiores concentrações são encontradas no Mar del Plata, na Argentina (CASTRO; PERINA; FILLMANN, 2012).

Um levantamento biológico-químico integrado foi realizado na Baía da Guanabara para investigar os níveis de contaminação por substâncias organicoestânicas. Foram encontrados sedimentos com uma concentração do TBT variando entre 10-522 ng (Sn ng/g), sendo as que as maiores concentrações estavam próximas dos estaleiros navais (FERNANDEZ et.al., 2005). Godoi et. al. (2003b), avaliaram as concentrações de TBT, DBT e MBT, em sedimentos de cinco locais diferentes, na costa paulista, encontrando concentrações entre 17 a 847 ng (Sn ng/g). Guarujá foi a cidade que apresentou a maior concentração de TBT dentre as analisadas no estudo.

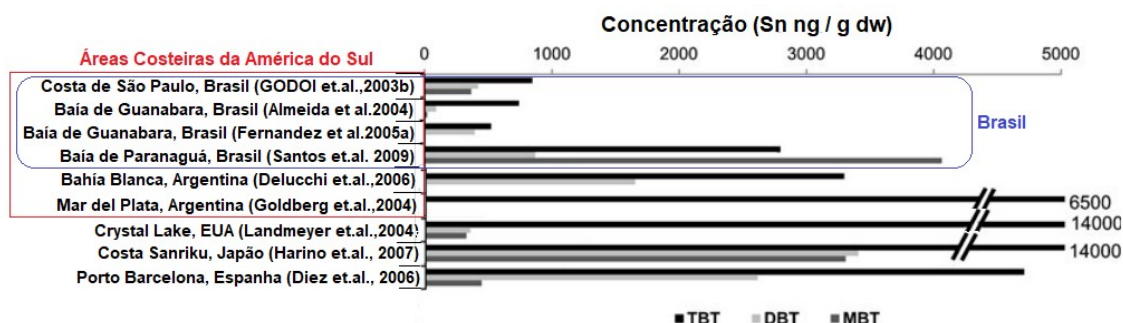


Figura 2: Concentrações mais altas de butilestanho (Sn ng/g dw) detectadas em sedimentos superficiais da América do Sul em comparação com outras determinações mundiais. Modificado CASTRO; PERINA; FILLMANN, 2012.

Já no estado do Espírito Santo, Costa et. al. (2014) analisaram amostras de sedimentos de 6 pontos da costa (Praia formosa, Ilha do Frade, Ilha do Boi, Praia da Direita, estação 5), sendo encontrados altos níveis de contaminação por compostos organoestânicos nos sedimentos, com os valores para TBT variando entre 383,7 e 7173 ng/g.

Tabela 1: Concentrações de Tributilestanho (ng/g \pm desvio padrão relativo) para estações analisadas ao longo da costa de Vitória, sudeste do Brasil (DE COSTA et.al., 2014).

Local	Concentração de TBT (ng/g)
Canal da Passagem (ES)	7173 \pm 1,5
Iate Clube (ES)	448 \pm 22
Ilha do Frade (ES)	398 \pm 9
Ilha da Fumaça (ES)	509 \pm 5

1.7. Distribuição e Toxicidade do Tributilestanho

No metabolismo dos mamíferos, os metabolitos do TBT são detectáveis no sangue dentro de 3 horas após a administração. Porém em outros organismos como os moluscos, seu metabolismo é mais lento tornando a capacidade de bioacumulação maior (WHO, 1997).

O TBT se distribui em diversos tecidos, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e a barreira placentária, sendo armazenado rapidamente entre os tecidos (fígado, rins, sistema imune e reprodutivo) (MITRA et.al, 2013). Bertuloso et. al. (2015) demonstraram que ratas expostas, por 15 dias, a 0,1 μ g/kg de TBT apresentaram alterações metabólicas no fígado, pâncreas e tecido adiposo. Segundo de Araújo et. al. (2018), ratas tratadas por 30 dias com TBT, na dose de 100 ng/Kg, apresentaram ciclo estral irregular, alterações nos níveis dos hormônios sexuais ovarianos e do desenvolvimento folicular ovariano. Além disso, esses animais possuíam adipogênese ovariana alterada com aumento dos níveis de colesterol e acúmulo de lipídios (DE ARAÚJO et.al., 2018).

Um estudo com ratos machos demonstrou que a exposição por 30 dias ao TBT (1 e 5 mg/kg) foi capaz de aumentar os níveis de estanho no fígado, rins, sangue e

pulmão (MITRA et.al., 2013). Nesse trabalho, foi possível verificar o aumento da concentração sérica das espécies reativas de oxigênio, sem a alteração da peroxidação lipídica. Outro achado foi a redução da viabilidade celular no grupo exposto ao TBT, porém quando administrado agentes antioxidantes, esses foram capazes de aumentar a viabilidade celular (MITRA et.al., 2013).

Segundo Ogata et. al. (2001), os compostos organoestânicos são capazes de induzir uma síndrome endócrina, referida como imposex, no qual ocorre a super imposição da genitália masculina em fêmeas, levando a alterações das funções reprodutivas. Podratz et.al. (2015), demonstraram que a exposição aos organoestânicos causa alterações morfofisiológicas em tecidos ovarianos e uterinos, além de causar desequilíbrios nos hormônios sexuais.

O TBT possui intensa ação neurotóxica. O tratamento por 3 dias com TBT (entre 30 e 50 nM) promoveu morte neuronal. A citotoxicidade do TBT foi mais grave em neurônios imaturos, pois foi capaz de prejudicar as sinapses (YAMADA et.al., 2010). Em células humanas o TBT reduziu a expressão de genes responsáveis pela diferenciação neural. A neurotoxicidade gerada pode ser devido a disfunção mitocondrial (YAMADA et.al., 2018).

Em células de neuroblastoma humano, o TBT nas concentrações de 250 nM a 2 µM, por 24 horas, foi capaz de reduzir a viabilidade celular. Nas concentrações de 50 e 100 µM, o TBT causou a fragmentação do DNA do neuroblastoma, e na concentração de 5 µM, causou morte celular com danos na membrana celular (FERREIRA et.al., 2013).

1.8. Efeitos vasculares do TBT

A disfunção endotelial está ligada aos fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Sendo o TBT capaz de alterar a função vascular, tanto em artérias de condutância quanto de resistência. Na aorta, a exposição ao TBT, por 15 dias, na dose de 100 ng/Kg, foi capaz de aumentar a deposição de colágeno e a produção de espécies reativas de oxigênio, podendo ser capaz de levar a uma disfunção endotelial (RODRIGUES et.al., 2014). Em artérias mesentéricas de resistência, a

exposição ao TBT na dose de 500 ng/kg por 15 dias, foi capaz de promover rigidez arterial e aumentar a deposição de colágeno, a velocidade da onda de pulso e a expressão vascular dos receptores de angiotensina II. Além disso, a produção das EROs estava aumentada, provavelmente por ativação da NADPH oxidase (RIBEIRO JÚNIOR et.al., 2016).

Um estudo demonstrou que após 48 horas de exposição ao TBT, foi detectado efeito citotóxico nas células endoteliais e apoptose celular (BERNARDINI et.al., 2016). Além disso, observa-se um efeito dependente da dose, pois em 24 horas de exposição ao TBT, observou-se que ao aumentar sua concentração houve uma redução da viabilidade celular e aumento de apoptose e necrose celular, das células endoteliais de mamíferos (BOTELHO et.al., 2015).

1.9. Regulação da reatividade vascular

1.9.1. Músculo liso vascular

A estrutura vascular das artérias é composta de três camadas, sendo elas a túnica adventícia, túnica média e túnica íntima. A composição histológica da camada média é principalmente de células musculares lisas, diferente das camadas externa e interna que são compostas principalmente de tecido conjuntivo e células endoteliais (WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009).

Diversas sinalizações extracelulares, como neurais, humorais, iônicas e mecânicas, são capazes de produzir contração ou relaxamento do músculo liso vascular, no qual, a regulação do diâmetro e tônus vascular é mediada pelo equilíbrio entre a contração e relaxamento vascular (WOODRUM; BROPHY, 2001).

A contração do músculo liso vascular é iniciada por aumento nas concentrações de Ca^{2+} intracelular. Esse, por sua vez, pode ser obtido pelo influxo de cálcio extracelular através dos canais de Ca^{2+} controlados por voltagem, presentes na membrana plasmática celular, que por sua vez promovem a liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS). Esse influxo de cálcio ocorre devido à sua maior concentração no meio extracelular em comparação como intracelular. A contração

do músculo liso vascular está associada à fosforização da cinase da cadeia leve da miosina (CCLM) dependente da interação do Ca^{2+} com a calmodulina. A CCLM fosforilada permite a interação das pontes cruzadas entre actina-miosina resultando na contração muscular. O relaxamento do músculo liso vascular depende da redução da concentração de Ca^{2+} intracelular, principalmente via recaptação para o retículo sarcoplasmático por meio da bomba de Ca^{2+} (SERCA). A redução da concentração de Ca^{2+} intracelular permitirá a dissociação entre o complexo cálcio-calmodulina e a desfosforilação da cinase da cadeia leve da miosina pelas fosfatases (WOODRUM; BROPHY, 2001; SOMLYO AP, SOMLYO AV. 2003; WEBB, 2003; WAMHOFF; BOWLES; OWENS, 2015; LIU; KHALIL, 2018). O endotélio possui também um importante papel na produção e liberação de fatores que regulam o tônus vascular

1.9.2. Endotélio vascular

Diversas doenças cardiovasculares estão associadas à alteração do relaxamento do endotélio, dentre elas estão a aterosclerose, diabetes *mellitus*, hipertensão e insuficiência cardíaca (DREXLER; HORNIG, 1999).

O endotélio é capaz de produzir e liberar fatores vasodilatadores e vasoconstritores, que regulam o tônus vascular, a resposta inflamatória e a proliferação celular vascular (VANHOUTTE et.al. 2016).

1.9.3. Fatores relaxantes e constritores derivados do endotélio

O endotélio vascular íntegro é capaz de produzir fatores relaxantes e constritores que promovem vasodilatação ou vasoconstrição. As principais substâncias vasodilatadoras são: o óxido nítrico (NO), fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI_2); e as principais substâncias vasoconstritoras são: endotelina-1 (ET-1), angiotensina II, prostaglandinas (PGH_2), tromboxano A_2 (TXA_2), e espécies reativas de oxigênio: ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxido nitrito (ONOO^-) (BATLOUNI, 2001; ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004; VANHOUTTE et.al., 2016)

As EROs são produzidas por vários sistemas enzimáticos, dentre eles estão inseridos a NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase (NOS) desacoplada e a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Em balanço a esse sistema, existem as enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase; esses dois sistema quando em situações fisiológicas normais estão em equilíbrio. Porém em algumas doenças como hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes *mellitus*, a geração de EROs está elevada, resultando no estresse oxidativo. (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014).

1.9.4. Angiotensina II e produção de espécies reativas de oxigênio.

A angiotensina II (Ang II) é um hormônio produzido no sistema renina-angiotensina. Sua formação depende de várias etapas sendo uma das primeiras dependente da clivagem enzimática do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I) pela renina. Em seguida, a enzima conversora da angiotensina (ECA) promove a conversão da Ang I em Ang II. Além disso, a Ang II é um peptídeo vasoativo produzido sistemicamente e localmente na parede vascular, participando da regulação de vários mecanismos no sistema cardiovascular (CAT et.al., 2013).

A sinalização da angiotensina II ocorre principalmente via ligação aos receptores acoplados à proteína G, tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂) (WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009; CAT et.al., 2013;).

Nos vasos, o receptor AT₂ está localizado principalmente na camada adventícia, e está envolvido no crescimento celular e na vasodilatação. Já os receptores AT₁, estão localizados tanto no endotélio quanto no músculo liso vasculares sendo responsáveis por funções como, por exemplo: hipertrofia, inflamação e vasoconstrição. Além disso, a Ang II é capaz de ativar NADPH oxidase (Nox), que por sua vez, é uma importante fonte geradora de EROs nas células vasculares, principalmente o O₂⁻ e o H₂O₂ presentes na fisiopatologia das doenças cardiovasculares (MEHTA; GRIENDLING, 2007; WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009; CAT et.al., 2013).

A exposição ao TBT causa alterações vasculares, provavelmente através das vias demonstradas na figura abaixo (RONCONI; STEFANON; RIBEIRO JÚNIOR, 2018).

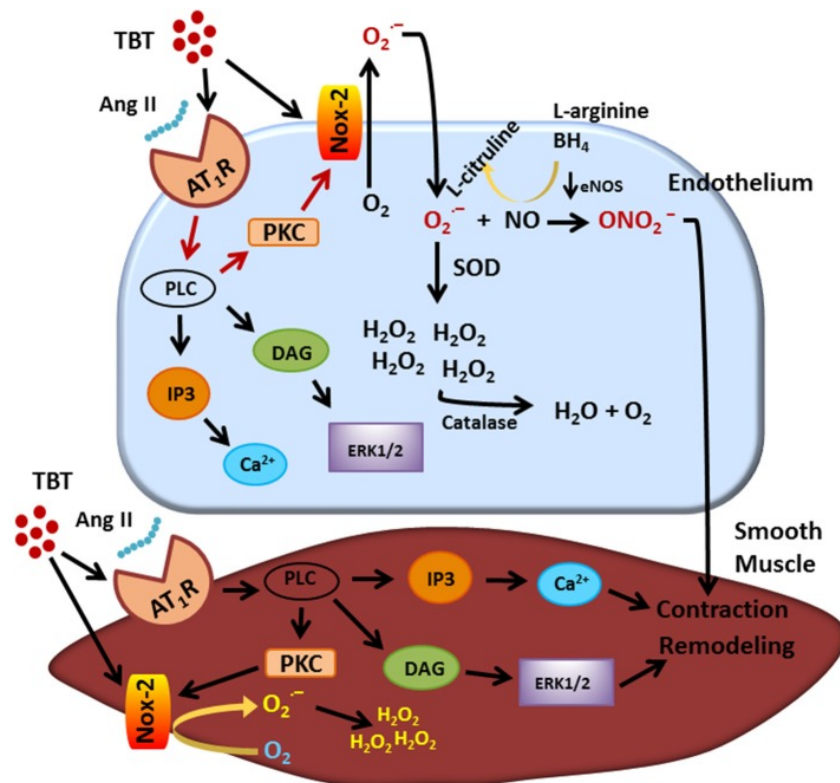


Figura 3: Resumo das principais ações do TBT no endotélio e no músculo liso vascular. RONCONI; STEFANON; RIBEIRO JÚNIOR, 2018.

1.10. Hipótese

Já foi demonstrado que a exposição por 15 dias ao TBT é capaz de modificar a reatividade vascular, e induzir stress oxidativo (RODRIGUES et.al., 2014; RIBEIRO JUNIOR et.al., 2016; XIMENES et.al., 2017, RONCONI; STEFANON; RIBEIRO JÚNIOR, 2018). Entretanto, ainda não foi descrito se a exposição a uma única dose de TBT seria capaz de produzir algum dano vascular.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da exposição a uma única dose de TBT (500 ng/kg) sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta de ratas.

2.1. Objetivos Específicos

Investigar os efeitos da exposição ao TBT (500 ng/kg) em segmentos isolados de aorta torácica sobre:

- A reatividade vascular à fenilefrina e função endotelial;
- A reatividade vascular à acetilcolina;
- A produção de EROs;
- A participação da angiotensina II;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus Novergicus Albinus*) fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pesando entre 240 e 260 g, com condições de temperatura controladas, possuindo ciclo claro/escuro de 12:12 horas e livre acesso à ingestão de água e ração. Todos os protocolos desenvolvidos foram aprovados pela Comissão de Ética-UFES para pesquisa com animais (CEUA-UFES 027/2016).

3.1.1. Grupos experimentais:

Os animais foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos:

- Grupo Controle: os animais receberam uma única dose da solução aquosa de etanol 0,4%, via gavagem, 24 h antes do sacrifício.
- Grupo TBT: os animais receberam uma única dose de solução aquosa de cloreto de Tributilestanho (500 ng/Kg) (TBT 96% de pureza, pm= 325,5), via gavagem, 24 h antes do sacrifício.

3.2. Protocolos experimentais

3.2.1. Preparação dos anéis de aorta

Após 24 h de exposição, os animais foram anestesiados com Ketamina (50 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg), via intraperitoneal e, quando não apresentarem mais o reflexo a dor, o tórax foi aberto, o diafragma cortado, a aorta torácica foi retirada e colocada em uma placa de Petri com solução de Krebs (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; MgSO_4 1,2; KH_2PO_4 1, 17; NaHCO_3 25; EDTA 0,01 e glicose).

Em seguida, o tecido conectivo e adiposo ao redor da aorta foi removido, e posteriormente a aorta foi cortada em anéis, com comprimento entre 3-4 mm (Figura 4) (ANGELI et.al., 2011). Para realização do grupo sem endotélio (E-), o mesmo foi

retirado de modo mecânico (através da secção de uma haste metálica no lúmen do vaso), com cautela para evitar a lesão ao músculo liso vascular.

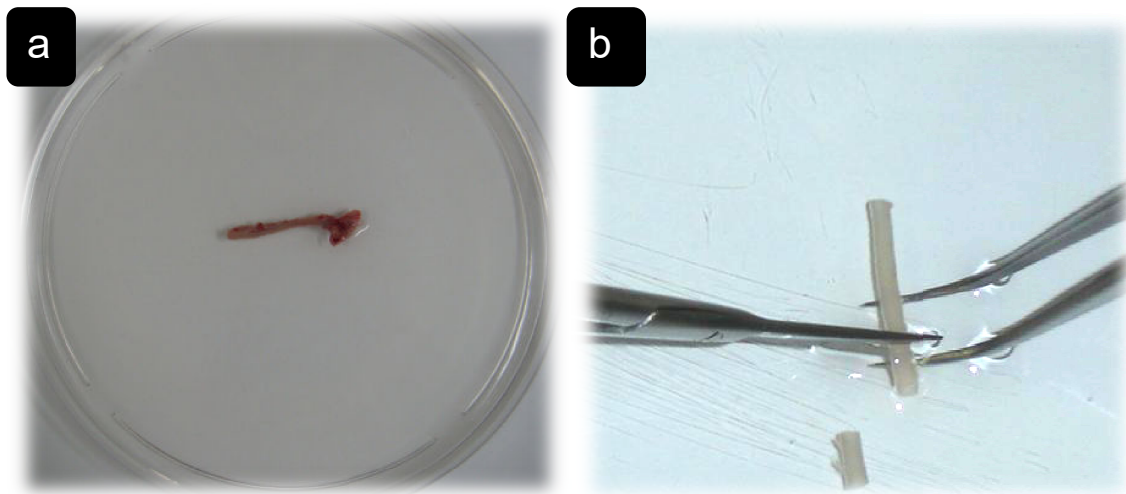


Figura 4: (a) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (b) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm.

3.2.2. Obtenção dos registros para estudo da reatividade vascular em anéis de aorta.

Os anéis de aorta foram imersos em uma cuba com temperatura de $37 \pm 0,5$ °C, contendo 5 mL de solução de Krebs, estando continuamente aerada com mistura carbogênica, para manutenção de um pH 7,4. Esses anéis eram colocados entre duas hastes metálicas, em forma de triângulos, da forma que cada triângulo ficasse paralelo ao lúmen do vaso. Uma extremidade do triângulo foi fixada na parte inferior do banho e o outro triângulo foi conectado a um transdutor de força isométrica (FT03, Grass), no qual estavam conectados ao sistema de aquisição de dados (BIOPAC, modelo MP100) e ligados a um computador (Figura 5). Possibilitando assim, o registro da tensão vascular desses vasos.

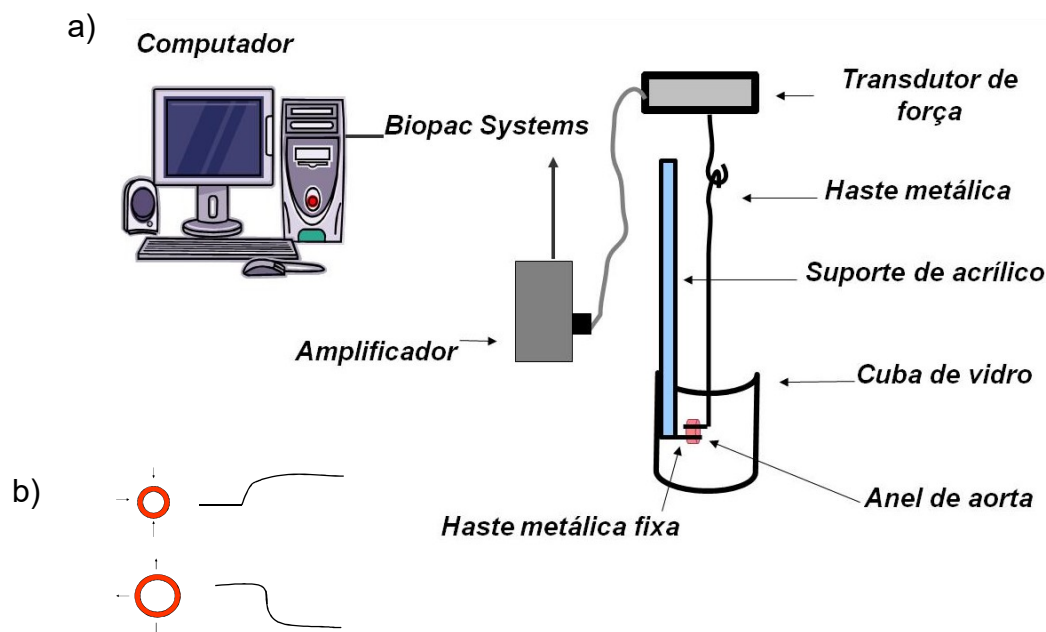


Figura 5: a) Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems. b) Deflexão positiva indicando uma contração do anel vascular e abaixo, uma deflexão negativa, indicando o relaxamento do anel vascular (DIAS, 2007).

3.2.3. Avaliação funcional dos anéis isolados de aorta

Os anéis de aorta recebiam uma tensão inicial de 1g e, após 45 minutos de estabilização (Figura 6 A), foi adicionado cloreto de potássio (KCl) 75 mM, em cada banho, para verificar a atividade contrátil induzida por despolarização do músculo liso vascular (Figura 6 B). Os anéis que aumentavam a tensão em 1g de força foram lavados com solução de Krebs, e os anéis que não contraíam foram descartados (Figura 6 C). Após 30 minutos de estabilização (Figura 6 D), uma nova dose de KCl 75 mM foi adicionada em cada banho (Figura 6 E), e essa incubada por aproximadamente 30 minutos para, visando atingir um platô no registro de contração (Figura 6 F). Após o platô, os anéis foram novamente lavados (Figura 6 G) e estabilizados por aproximadamente 30 minutos (Figura 6 H) sendo então submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

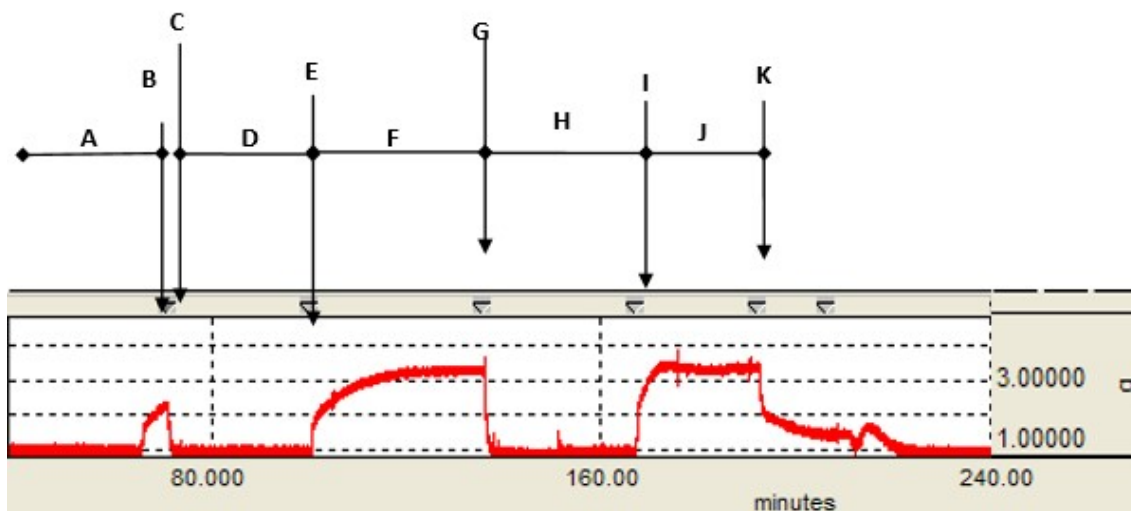


Figura 6: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 1 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina 10^{-7} M; J) Platô da contração induzida pela fenilefrina. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g) no eixo vertical.

3.2.4. Avaliação da participação endotelial

Após o período de estabilização (30 minutos), os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-8} a 10^{-7} M (Figura 6 I) até atingir entre 50 a 75 % da contração obtida pelo KCl. Ao fim da contração, quando o anel alcançava um platô (Figura 6 J), uma única dose de ACh (10^{-5} M) foi aplicada, testando, assim, a integridade endotelial dos anéis (Figura 6K). Os anéis que possuíam relaxamento menor que 80 % eram descartados, e os anéis que contraíram ou relaxaram igual ou menos que 10 %, contração obtida pelo KCl, foram utilizados como anéis sem endotélio.

3.2.5. Avaliação da resposta vasoconstritora a fenilefrina

Depois de avaliada a integridade funcional do endotélio, os anéis eram lavados com solução de Krebs, por três vezes, para que a tensão basal fosse restabelecida. E, após 30 minutos de estabilização, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa. Todas as respostas à fenilefrina foi normalizada e expressa em % pela contração máxima ao KCl.

3.2.6. Avaliação dos fatores endoteliais envolvidos na resposta vasoconstritora a fenilefrina

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir desta etapa, seguiram o mesmo padrão. Após a avaliação funcional e o teste de integridade do endotélio, os fármacos foram incubados por 30 minutos e, em seguida, era realizada uma curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M).

3.2.6.1. Influência da via do óxido nítrico sobre a resposta contrátil a fenilefrina

Para avaliar a participação do óxido nítrico (NO), os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

3.2.6.2. Influência das espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre a resposta contrátil a fenilefrina

Para avaliar a atuação das EROs, foram incubados os seguintes agentes antioxidantes: Apocinina (APO, 30 μ M), como um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase; Tiron (1 mM), um varredor de O_2^- e Catalase (1000U·mL⁻¹).

3.2.6.3. Influência angiotensina II sobre a resposta contrátil a fenilefrina

Para verificar uma possível participação da angiotensina II local, foi utilizado Losartan, um antagonista dos receptores AT1 (10 μ M).

3.2.7. Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio

A resposta vasodilatadora dependente do endotélio foi avaliada através da indução do relaxamento pela acetilcolina, sendo que os anéis de aorta, com endotélio, foram pré-contraídos com fenilefrina (10^{-7} M ou até atingir de 60 a 70 % da contração do KCl). Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta cumulativas da acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M).

3.3. Quantificação da produção do ânion superóxido (O_2^-).

Para investigar a influência, de uma exposição aguda, ao TBT sobre a produção de O_2^- , foi utilizado a fluorescência oxidativa ao dihidroetídio (DHE, fluorescência produzida pela oxidação ao dihidroetideo). O DHE é um derivado do etídio, que se oxida ao entrar em contato com O_2^- , e se liga ao DNA das células emitindo fluorescência detectada pelo filtro vermelho. Com isso, este método possibilita uma análise da produção O_2^- tecidual.

Para realização dessa técnica, as aortas foram isoladas e dissecadas, e seus anéis colocados em eppendorfs contendo uma solução de Krebs-HEPES com sacarose à 30%. Esses eppendorfs foram mantidos, na geladeira, por 1 hora.

Posteriormente, estes segmentos foram armazenados e congelados em meio adequado (meio de congelamento, Tissue TeK-OCT) para serem cortados no criostato. As amostras foram mantidas congeladas a -80° C até a realização dos cortes. Os segmentos de aorta foram cortados na espessura de 10 μ m e colocados em lâminas gelatinizadas, em seguida, foram congeladas até a realização do protocolo de DHE.

No dia do protocolo da marcação com DHE, as lâminas contendo os cortes foram mantidas em estufa a 37° C por 30 minutos, em seguida foram lavadas e posteriormente incubadas com Krebs HEPES (Para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de $CaCl_2$, 759 mg de NaCl, 41,7 mg de KCl, 4,9 mg de $MgCl_2$, 197,8 mg de HEPES e 198,2 mg de glicose) uma câmara úmida a 37° C. No grupo com antioxidantes foram

também incubados os respectivos agentes (Apocinina, Tiron, Catalase ou Losartan). Depois desse período, o Krebs foi escorrido e o excesso seco. Posteriormente, foi realizada incubação solução tampão de Krebs-HEPES contendo DHE (2 μ M) em câmara úmida e protegida da luz, à temperatura de 37° C por 30 min, nesse momento, para o grupo com antioxidantes também incubados os respectivos agentes (Apocinina, Tiron, Catalase ou Losartan). Após este período as lâminas foram montadas com meio de montagem e lamínula.

A luminescência emitida foi visualizada com microscópio de fluorescência confocal (Leica 2500 DM) e câmera fotográfica (NIKON digital sigth DS-U2) com filtro de fluorescência para DHE. O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com λ_{exc} = 585 nm e detectado com λ_{em} = 600-700nm. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software Image J.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental. As respostas vasoconstritoras induzidas pela fenilefrina foram normalizadas pela contração máxima ao KCl do respectivo anel e expressas em porcentagem. Foram calculadas as respostas máximas (R_{máx}) e o logaritmo da concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo à fenilefrina (pD₂). Para comparar a magnitude do efeito da incubação com L-NAME, Apocinina (APO), Catalase (CAT) e Losartan (LOS) as diferenças da área abaixo das curvas (dAUC) foram calculadas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste t de *Student* não pareado, análise de variância (ANOVA) uma ou duas vias com teste post hoc de Bonferroni quando necessário. O nível de significância foi considerado até o valor de $p < 0,05$.

5. FARMÁCOS E REAGENTES UTILIZADOS

Acetilcolina, cloridrato (Sigma)

Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)

Bicarbonato de Sódio (Merck)

Catalase (Sigma)

Cloreto de Magnésio Heptahidratado (Merck)

Cloreto de Potássio (Merck)

Cloreto de Sódio (Merck)

Cloreto de Tributilestanho (Sigma)

Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Hoescht)

Etanol absoluto (Sigma)

Fosfato de Potássio Monobásico (Cinética)

Fosfato de Sódio Monobásico (Merck)

Glicose (Merck)

HEPES (SIGMA)

Hidróxido de sódio (Sigma)

L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)

NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)

Tiron (Sigma)

Losartan (Sigma)

6. RESULTADOS

6.1. Efeito de uma dose de Tributilestanho sobre a resposta ao Cloreto de Potássio (KCl) nos anéis isolados de aorta de ratas

A contração promovida pelo cloreto de potássio (KCl) não foi diferente entre os grupos Controle e Tributilestanho, (CT: $2,55 \pm 0,08$; TBT: $2,44 \pm 0,07$ g, $n=10$ para ambos os grupos) (Figura 7).

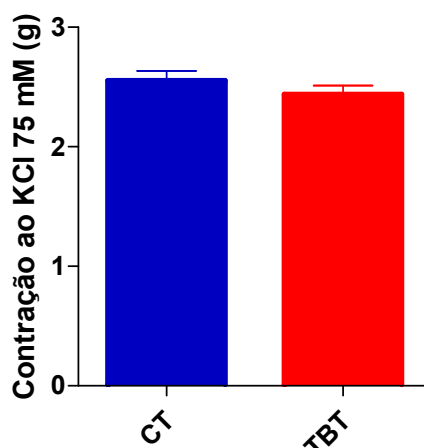


Figura 7: Avaliação das respostas dos anéis de aorta ao KCl 75 mM em ratas dos grupos Controle (CT, $n=10$) e Tributilestanho (TBT, $n=10$). Dados expressos em Média \pm EPM. Não houve diferença entre os grupos. Teste t de *Student* não pareado.

6.2. Efeitos de uma dose de Tributilestanho sobre a reatividade vascular à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratas.

Como esperado, a adição de fenilefrina ao banho nos anéis isolados de aorta induziu uma resposta vasoconstritora de maneira concentração-dependente tanto no grupo Controle (CT, $n=9$) quanto no grupo exposto ao Tributilestanho (TBT, $n=6$) (Figura 8). No entanto, a resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) foi maior nos animais do grupo TBT; (CT, $n=9$: 110 ± 4 vs TBT, $n=6$: $142,2 \pm 7,2^{**}$ % de contração ao KCl, $^{**}p<0,01$ vs CT) (Figura 8 e Tabela 2). Além disso, a sensibilidade (pD_2) à fenilefrina também estava aumentada no grupo TBT (Tabela 2).

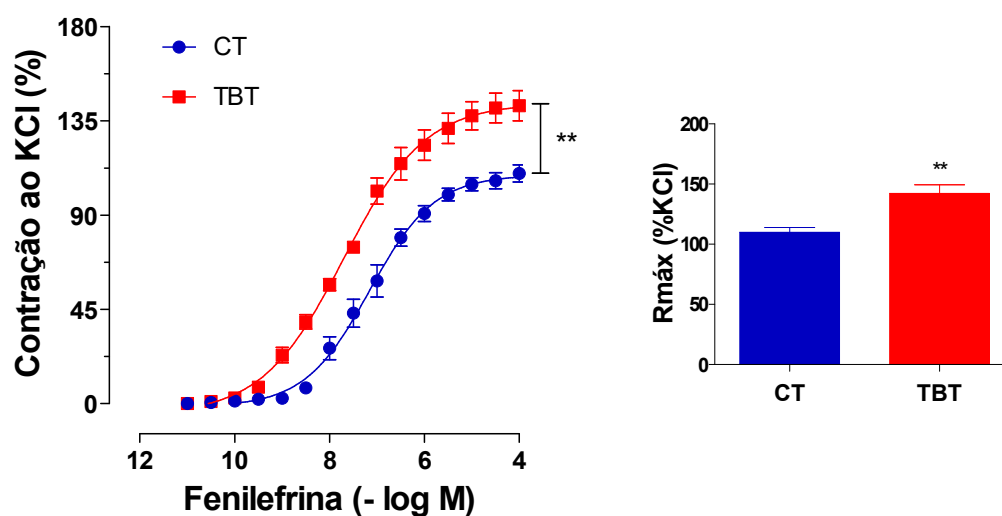


Figura 8: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Tributilestanho (TBT, n=6) e resposta máxima a fenilefrina (Rmáx). Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste t de *Student* não pareado para a comparação dos Rmáx; ANOVA 2 vias, post-hoc Bonferroni, quando comparadas as curvas de resposta a fenilefrina. ** p < 0,01 vs CT.

Tabela 2: Valores de resposta máxima (Rmáx, % de contração ao KCl) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratas dos grupos Controle (CT) e Tributilestanho (TBT).

	Rmáx (%)	pD ₂
CT (n=9)	110 \pm 4	7,19 \pm 0,13
TBT (n=6)	142 \pm 7,2**	7,68 \pm 0,08*

Tabela 2: Valores expressos em média \pm EPM. O número de animais é apresentado como valor de n. Rmáx: contração máxima. pD₂: sensibilidade (Log 50% de Rmáx). Teste t de *Student* não pareado. *p < 0,05 ; ** p < 0,01 vs CT.

6.3. Efeitos de uma dose de Tributilestanho sobre a participação do endotélio na reatividade vascular à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratas.

A remoção do endotélio induziu o aumento de $R_{\text{máx}}$ no grupo Controle (CT, $n=9$: 110 ± 4 vs CT E-, $n=6$: $156 \pm 11,5^{**}$ % de contração ao KCl, $^{**} p < 0,01$ vs CT) (Figura 9 a), e no grupo Tributilestanho também houve um aumento de $R_{\text{máx}}$ (TBT, $n=6$: $142,2 \pm 7,2$ vs TBT E-, $n=5$: $169,2 \pm 8,5$ # % de contração ao KCl, # $p < 0,05$ vs TBT)(Figura 9 b). Porém não houve diferença na sensibilidade a fenilefrina dos grupos TBT (Tabela 3).

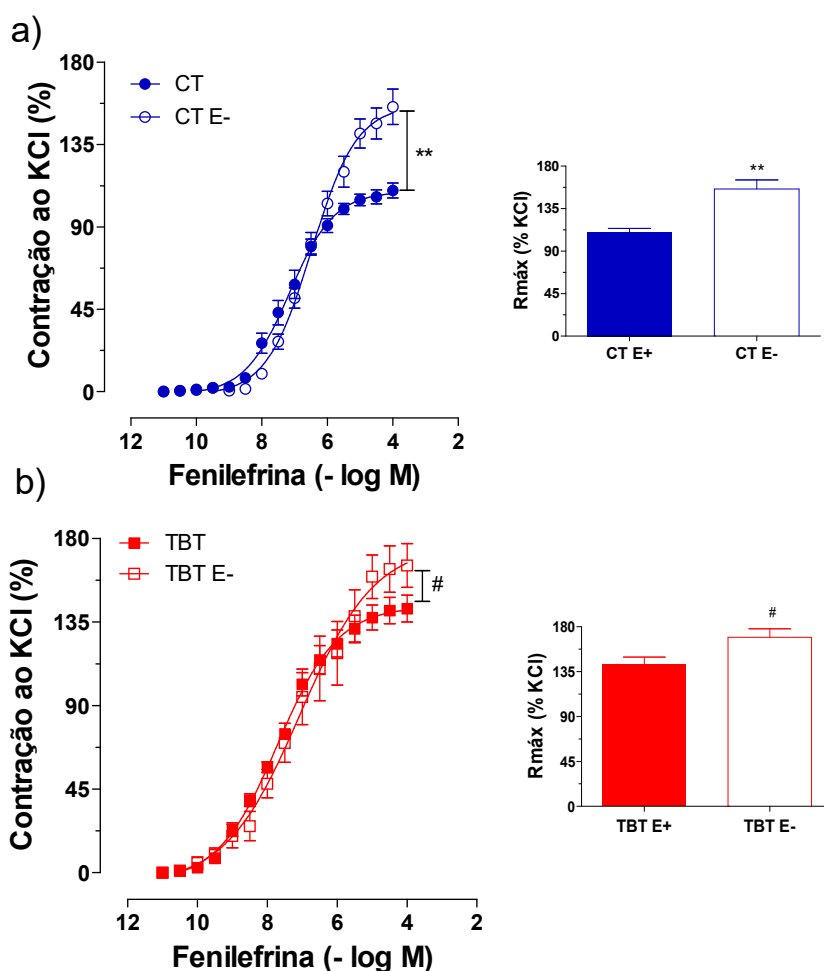


Figura 9: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, $n=9$) e Controle sem endotélio (CT E-, $n=7$) e resposta máxima a fenilefrina ($R_{\text{máx}}$). b) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestanho (TBT, $n=6$), Tributilestanho sem endotélio (TBT E-, $n=5$) e resposta máxima a fenilefrina ($R_{\text{máx}}$). Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste *t Student* não pareado para a comparação dos $R_{\text{máx}}$; ANOVA 2 vias, post hoc Bonferroni, quando comparadas as curvas de resposta a fenilefrina, $^{**} p < 0,01$ vs CT; # $p < 0,05$ vs TBT.

Tabela 3: Valores de resposta máxima (R_{máx}, % da contração ao KCl) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratas Wistar dos grupos Controle com endotélio (CT E+); Controle sem endotélio (CT E-); Tributilestanho com endotélio (TBT E+) e Tributilestanho sem endotélio (TBT E-).

	R _{máx}	pD ₂
CT E+ (n=9)	110± 4	7,16 ±0,07
CT E- (n=7)	155,6±9,6 ^{**}	6,48± 0,11 [*]
TBT (n=6)	142,2 ± 7,2	7,7 ± 0,10
TBT E- (n=5)	169,2±8,5 [#]	6,7± 0,5

Tabela 3: Valores expressos em média ± EPM. O número de animais é apresentado como valor de n. R_{máx}: Efeitos da contração máxima. pD₂: sensibilidade, no qual representa 50% da contração máxima. Teste t de *Student* não pareado. *p < 0,05e ** p < 0,01 vs CT. #p < 0,05 vs TBT.

6.4 Efeitos do óxido nítrico (NO) sobre a reatividade vascular à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratas tratadas com uma dose de Tributilestanho.

Os anéis isolados de aorta foram pré-incubados com L-NAME (100 µM) para avaliar a resposta contrátil à fenilefrina. A incubação com L-NAME aumentou o valor de R_{máx} em ambos os grupos, porém este aumento foi maior no grupo Controle (CT, n=9: 110 ± 4 vs CT L-NAME, n=6: 165,7 ± 8,6^{**} % da contração ao KCl, ** p<0,01) (Figura 10 a) e (TBT, n=6: 142 ± 7,2 vs TBT L-NAME, n=6: 175,5 ± 7,8[#] % da contração ao KCl, [#]p<0,05 vs TBT) (Figura 10 b). A sensibilidade (pD₂) à fenilefrina estava aumentada apenas no grupo Controle L-NAME (Tabela 4).

A análise da diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) evidenciou estas diferenças de resposta ao L-NAME. Foi possível observar que a dAUC foi menor no grupo TBT comparado ao Controle, sugerindo menor biodisponibilidade de NO (% dAUC CT= 35,7 ± 4,31 vs TBT= 54,4 ± 4,61 [#] %, p < 0,05, teste t de *Student*) (Figura 11).

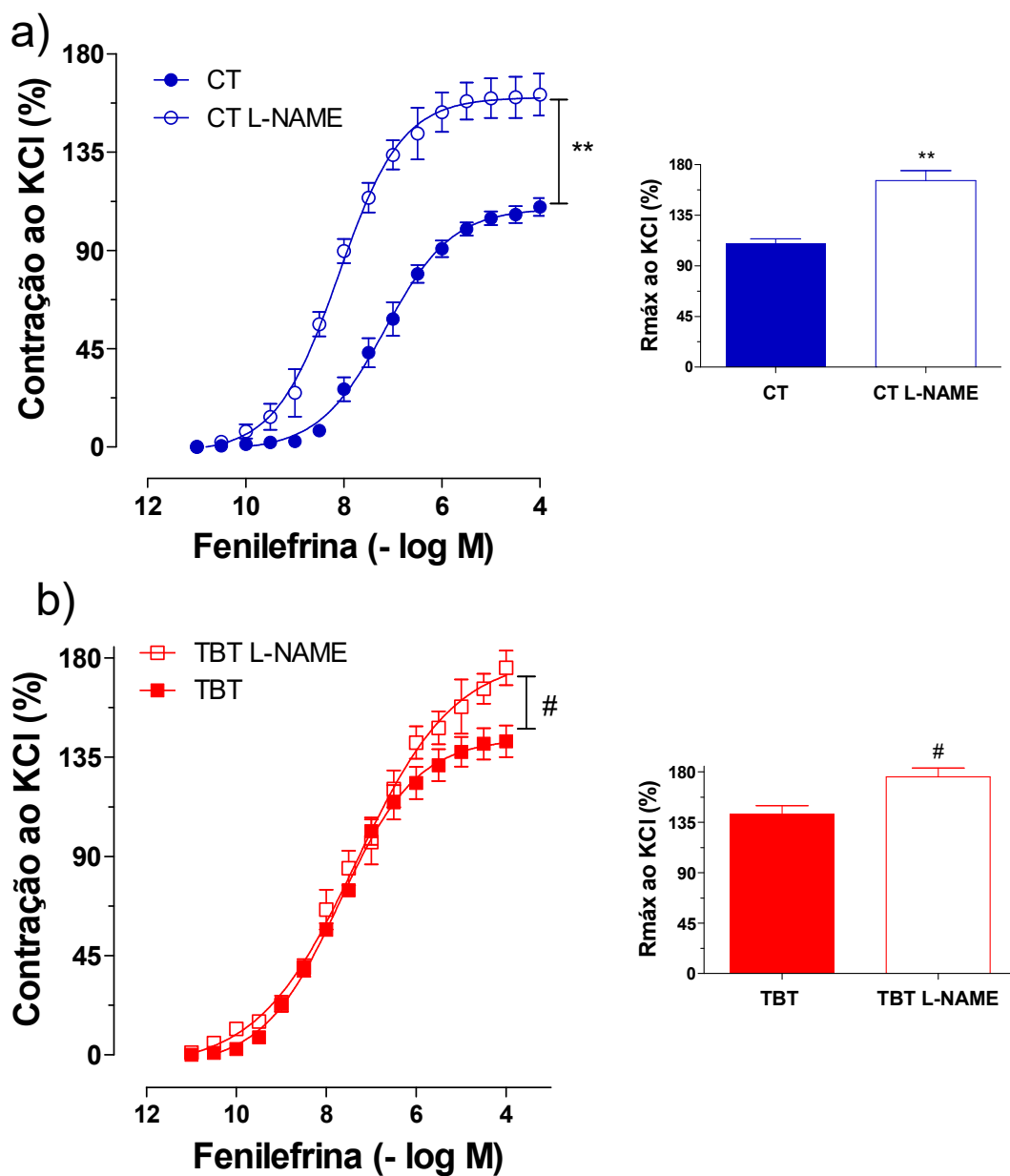


Figura 10: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Controle L-NAME (CT L-NAME, n=6). b) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestanho (TBT, n=6) e Tributilestanho L-NAME (TBT L-NAME, n=6). Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste t de *Student* não pareado para a comparação dos Rmáx; ANOVA 2 vias, post hoc Bonferroni, quando comparadas as curvas de resposta a fenilefrina. ** $p < 0,001$ vs CT; # $p < 0,05$ vs TBT.

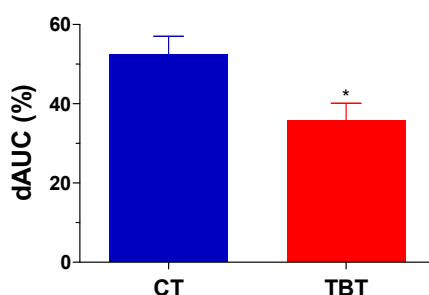


Figura 11: Representação gráfica da diferença do percentual da área abaixo da curva (dAUC%) entre os grupos Controle e Controle L-NAME (CT, n=6) comparada com os grupos Tributilestanho e Tributilestanho L-NAME (TBT, n=6). Teste t *Student* não pareado para a comparação das médias;* $p < 0,05$ vs CT.

Tabela 4. Valores de resposta máxima (R_{máx}, %) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratas Wistar do grupo Controle (CT) e Controle L-NAME (CT L-NAME), Tributilestanho (TBT) e Tributilestanho L-NAME (TBT L-NAME).

	R _{máx} (%)	pD ₂
CT (n=9)	110 ± 4	7,19 ± 0,13
CT L-NAME (n=6)	165,7 ± 8,6**	8,24 ± 0,18**
TBT (n=6)	142,2 ± 7,2	7,68 ± 0,08
TBT L-NAME (n=6)	175,5 ± 7,8 [#]	7,32 ± 0,23

Tabela 4: Valores expressos em média ± EPM. O número de animais está apresentado como n. Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) a fenilefrina. Teste t não pareado. ** $p < 0,01$ vs CT. [#] $p < 0,05$ vs TBT.

6.5. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos anéis isolados de aorta

6.5.1. Efeito da administração de Apocinina, um inibidor da NADPH oxidase:

Os anéis isolados de aorta foram pré-incubados com Apocinina (30 μM) para avaliar a resposta contrátil à fenilefrina. A incubação com Apocinina não alterou a resposta

máxima (R_{máx}) nos segmentos de aorta do grupo Controle (CT, n=9: 110 ± 4 vs CT APO, n= 5: 116,3 ± 7,11 % de contração ao KCl) (Figura 12 a); porém houve redução da resposta máxima (R_{máx}) no grupo Tributilestanho (TBT, n=6: 142 ± 7,2 vs TBT APO, n=6: 102,9 ± 5,42 ^{##} % de contração ao KCl, ^{##} p<0,01 vs TBT) (Figura 10 b e Tabela 5).

Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC). Estes resultados sugerem uma maior participação de EROs, via NADPH oxidase, no grupo exposto ao TBT (% dAUC CT= 7 ± 3,52 vs TBT= 41,6 ± 4,5 ^{##} %, p < 0,01 Teste t *Student*) (Figura 13).

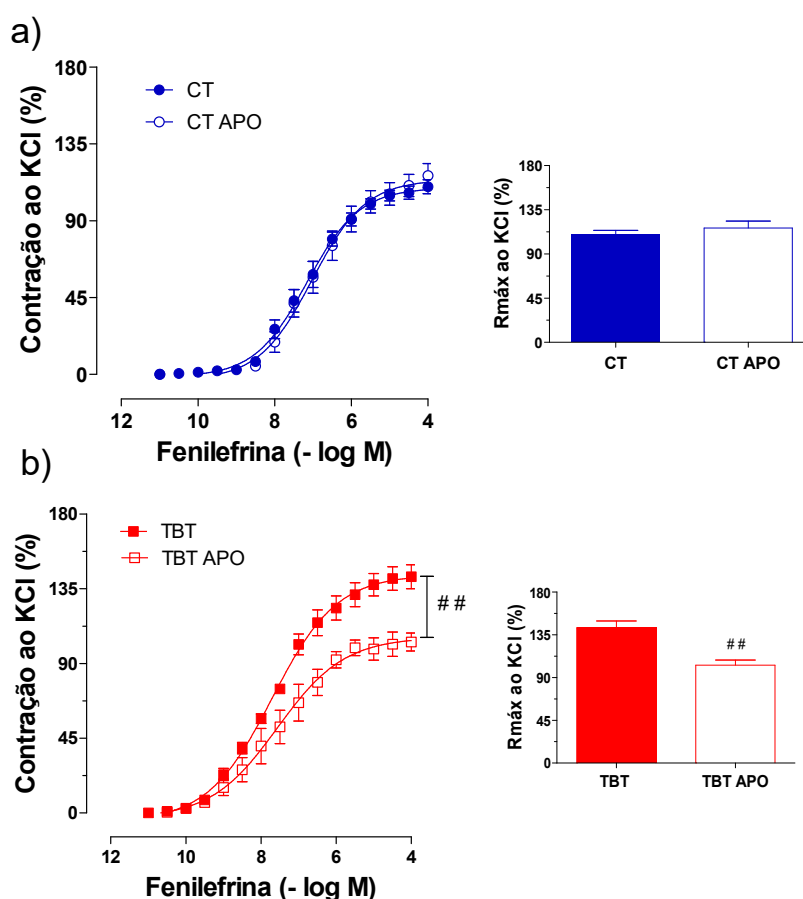


Figura 12: a) Curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Controle Apocinina (CT APO, n=5) e resposta máxima a fenilefrina (R_{máx}). b) Curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestanho (TBT, n=6) e Tributilestanho Apocinina (TBT APO, n=6) e resposta máxima a fenilefrina (R_{máx}). Os dados são expressos em média ± EPM. Teste t de *Student* não pareado para a comparação dos R_{máx}; ANOVA 2 vias, post hoc Bonferroni, quando comparadas as curvas de resposta a fenilefrina. ^{##} p < 0,01 vs TBT.

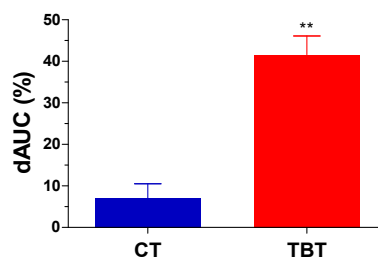


Figura 13: Representação gráfica da diferença do percentual de área abaixo da curva (dAUC %) entre o grupo Controle e Controle APO (n=5) vs Tributilestanho e Tributilestanho APO (n=6). Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste t *Student* não pareado para a comparação das médias; **p < 0,01 vs CT.

6.5.2. Efeito da administração do Tiron, um varredor de ânion superóxido (O₂⁻).

Os anéis isolados de aorta foram pré-incubados com Tiron (1 mM) para avaliar a resposta contrátil à fenilefrina. A incubação com Tiron não alterou a resposta máxima (R_{máx}) nos segmentos de aorta do grupo Controle (CT, n=9: 110 \pm 4 vs CT TIRON, n=7: 117,6 \pm 9,3 % de contração ao KCl) (Figura 14 a). Porém houve redução da resposta máxima (R_{máx}) nos grupos Tributilestanho (TBT, n=6: 142 \pm 7,2 vs TBT TIRON, n=6: 104,3 \pm 9,3 ^{##} % de contração ao KCl, ^{##} p<0,01 vs TBT) e redução da sensibilidade (pD₂) (Tabela 5).

Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC). Estes resultados sugerem uma maior participação de EROs citosólico no grupo exposto ao TBT (% dAUC CT= 6,54 \pm 1,62 vs TBT= 35,9 \pm 6,5 ^{**}%, p < 0,01 vs CT; Teste t *Student*) (Figura 14).

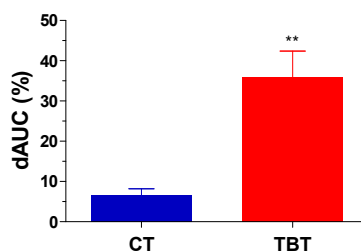
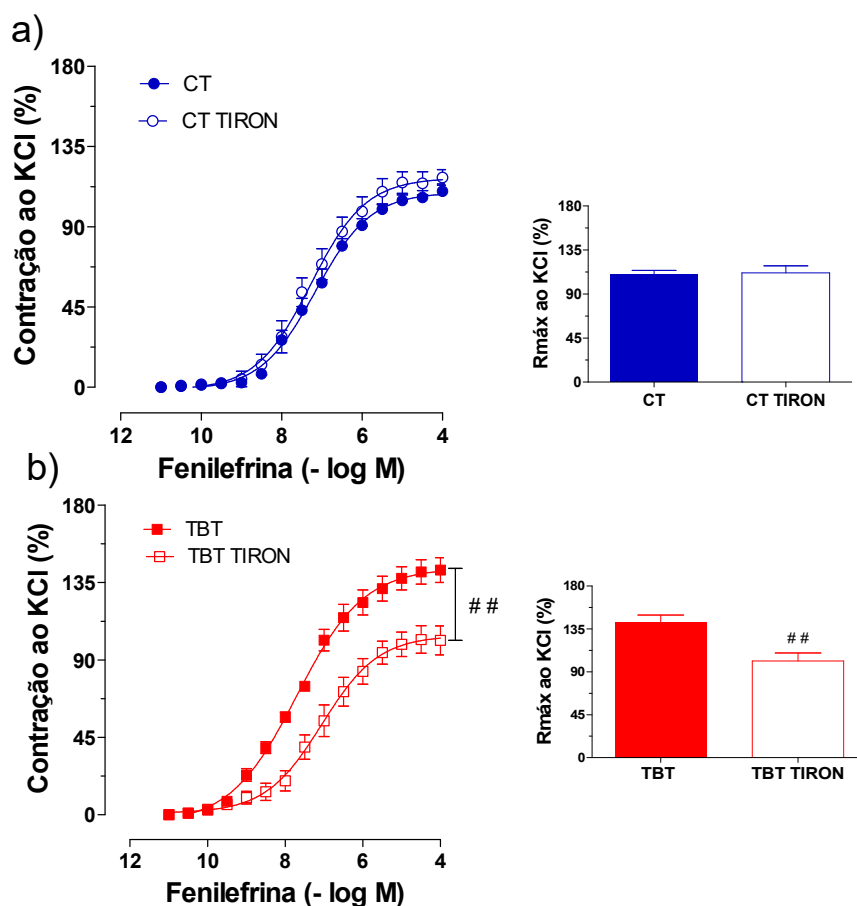


Figura 15: Representação gráfica da diferença do percentual de área abaixo da curva (dAUC %) entre os grupos Controle e Controle TIRON (n=7) vs Tributilestanho e Tributilestanho TIRON (n=6). Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste t *Student* não pareado para a comparação das médias; ** p < 0,01 vs CT.

6.5.3. Efeito da administração da Catalase, um varredor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Os anéis isolados de aorta foram pré-incubados com Catalase (CAT 1000 U·mL⁻¹) para avaliar a resposta contrátil à fenilefrina. A incubação com Catalase não alterou a resposta máxima (R_{máx}) nos segmentos de aorta do grupo Controle (CT, n=9: 110 ± 4 vs CT CAT, n=5: 111,5 ± 7,93 % de contração ao KCl) (Figura 16 a). Porém houve redução da resposta máxima (R_{máx}) nos grupos Tributilestanho (TBT, n=6: 142 ± 7,2 vs TBT CAT n=8: 89,16 ± 9,65 ^{##} % de contração ao KCl, ^{##} p<0,01 vs TBT) (Figura 16 b) e redução da sensibilidade (pD₂) (Tabela 5).

A diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC, Figura 17) foi maior no grupo TBT, o que sugere uma maior participação de EROs (% dAUC CT= 6,55 ± 2,27 vs TBT= 45,44 ± 5 ^{**} %, p < 0,01 vs CT; Teste t de *Student*).

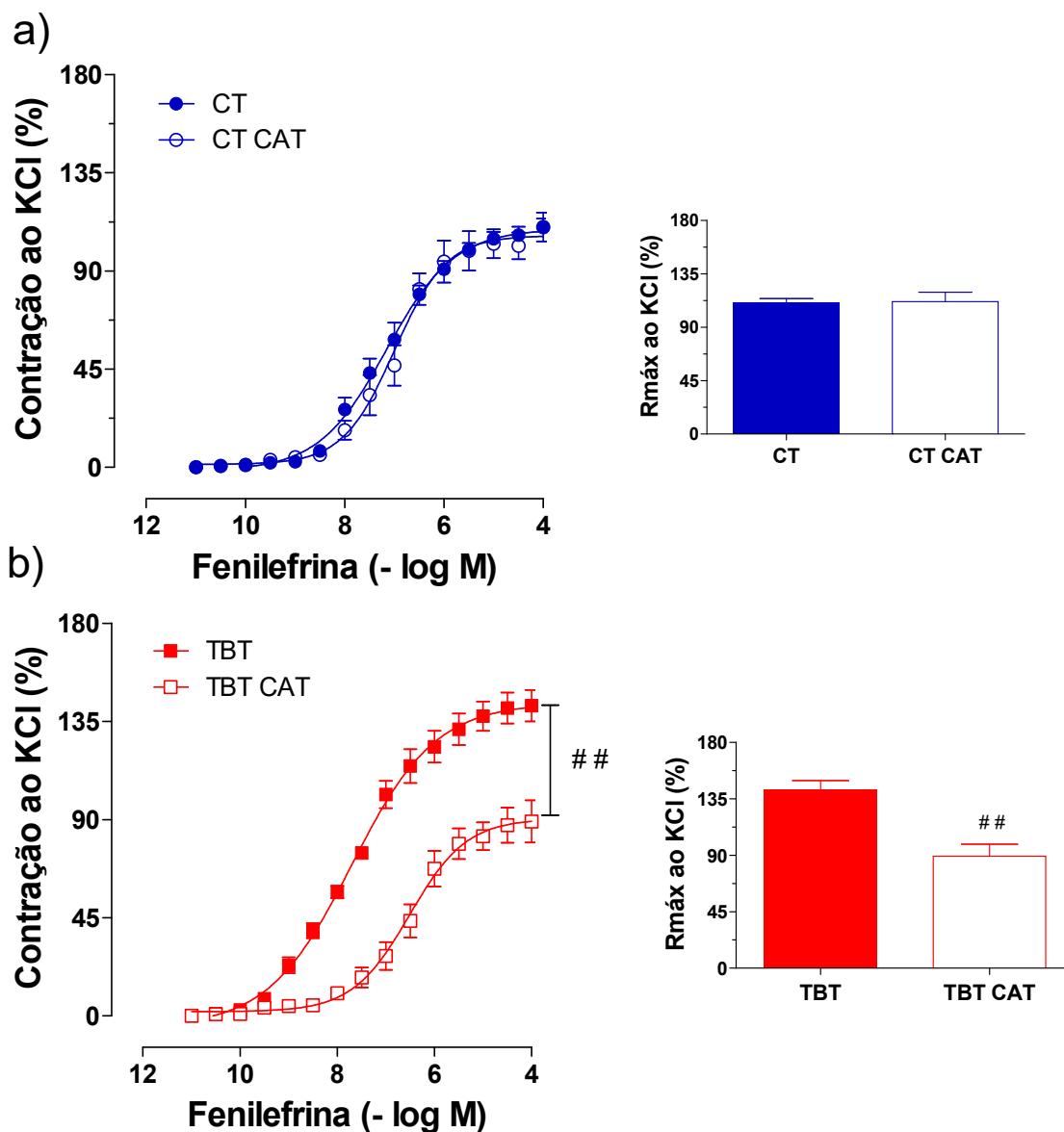


Figura 16: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Controle Catalase (CT CAT n=5) e resposta máxima a fenilefrina (Rmáx). b) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestanho (TBT, n=6) e Tributilestanho Catalase (TBT CAT, n=8). Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste t de *Student* não pareado para a comparação dos Rmáx; ANOVA 2 vias, post hoc Bonferroni, quando comparadas as curvas de resposta a fenilefrina. . ## $p < 0,01$ vs TBT.

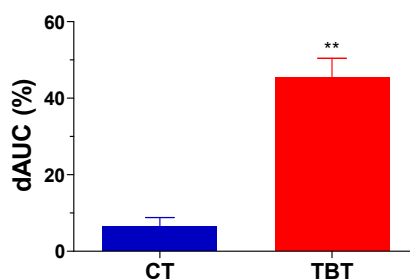


Figura 17: Representação gráfica da diferença do percentual de área abaixo da curva (dAUC %) entre o grupo Controle e Controle Catalase (n=5) versus Tributilestanho e Tributilestanho Catalase (n=6). Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste t *Student* não pareado para a comparação das médias; ** $p < 0,01$ vs CT.

6.6. Efeito de uma dose de Tributilestanho na regulação do sistema renina-angiotensina

Os anéis isolados de aorta foram pré-incubados com Losartan (LOS, $10\mu\text{M}$), para avaliar a resposta contrátil à fenilefrina. A incubação com Losartan reduziu $R_{\text{máx}}$ nos grupos Controle (CT, n=9: 110 ± 4 vs CT LOS, n= 6: $94,25 \pm 5,7^*$ % de contração ao KCl, * $p < 0,05$) (Figura 18 a) e Tributilestanho (TBT, n=6: $142 \pm 7,2$ vs TBT LOS, n=7: $101,8 \pm 7,4^{\#\#}$ % de contração ao KCl, $\#\# p < 0,01$ vs TBT) (Figura 10 b). A sensibilidade (pD_2) à fenilefrina também estava aumentada no grupo Tributilestanho LOS (Tabela 5).

A diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) foi maior no grupo TBT, sugerindo uma maior participação da via da Angiotensina II na vasoconstrição induzida pela fenilefrina (% dAUC CT= $18,82 \pm 2,14$ vs TBT= $32,32 \pm 1,97^*$ %, $p < 0,05$ vs CT; Teste t de *Student*) (Figura 19).

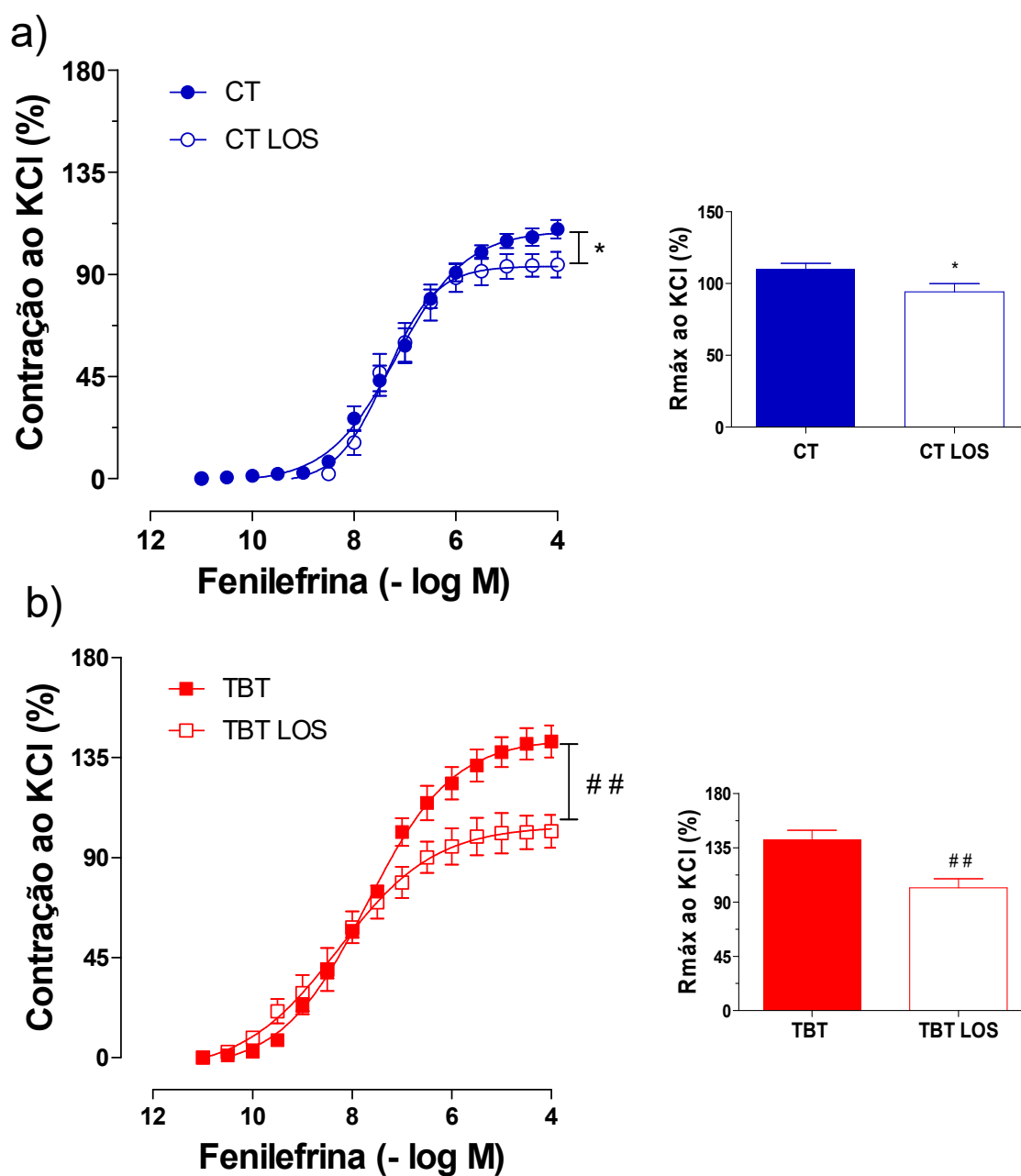


Figura 18: a) Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Controle (CT, n=9) e Controle Losartan (CT LOS, n=6) e resposta máxima a fenilefrina (Rmáx). b) Curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar, nos grupos Tributilestanho (TBT, n=6) e Tributilestanho Losartan (TBT L-NAME, n=7) e resposta máxima a fenilefrina (Rmáx). Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste t de *Student* não pareado para a comparação dos Rmáx; ANOVA 2vias, post hoc Bonferroni, quando comparadas as curvas de resposta a fenilefrina. * $p < 0,05$ vs CT; ## $p < 0,01$ vs TBT.

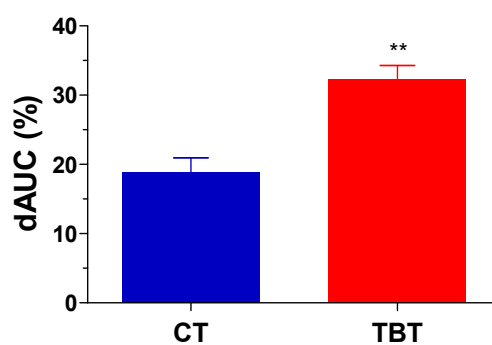


Figura 19: Representação gráfica da diferença do percentual de área abaixo da curva (dAUC%) entre o grupo Controle e Controle Losartan (n=6) vs Tributilestanho e Tributilestanho Losartan (n=6). Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste t *Student* não pareado para a comparação das médias;

* $p < 0,05$ vs CT

Tabela 5: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratas Wistar dos grupos Controle (CT), Controle Apocinina (CT APO), Controle Tiron (CT TIRON), Controle Catalase (CT CAT), Controle Losartan (CT LOS), Tributilestanho (TBT), Tributilestanho Apocinina (TBT APO), Tributilestanho Tiron (TBT TIRON), Tributilestanho Catalase (TBT CAT) e Tributilestanho Losartan (TBT LOS).

	R _{máx} (%)	pD ₂
CT (n=9)	110 ± 4	7,19 ± 0,13
CT APO (n= 5)	116,61 ± 7,11	7,0 ± 0,16
CT TIRON (n=7)	117,8 ± 4,4	7,26 ± 0,16
CT CATALASE (n=5)	111,5 ± 7,93	7,11 ± 0,21
CT LOS (n=6)	94,25 ± 5,7	7,3 ± 0,12
TBT (n=7)	142,22 ± 7,19 **	7,68 ± 0,08 *
TBT APO (n=6)	102,9 ± 5,42 ##	7,62 ± 0,26
TBT TIRON (N=6)	104,3 ± 9,3 ##	6,84 ± 0,22 ##
TBT CATALASE (n=8)	89,16 ± 9,65 ##	6,61 ± 0,25 ##
TBT LOS (n=7)	101,8 ± 7,38 ##	8,45 ± 0,25 #

Tabela 5: Valores expressos em média ± EPM. O número de animais é apresentado como valor de n. R_{máx}: Efeitos da contração máxima. pD₂: sensibilidade, no qual representa 50% da contração máxima. Teste t não pareado. *p < 0,05 ; ** p < 0,01 vs CT. #p < 0,05 ; ## p < 0,01 vs TBT.

6.7. Efeito de uma dose de Tributilestanho na resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Para avaliar a resposta vasodilatadora dependente do endotélio, foi utilizada a acetilcolina (ACh). A ACh promoveu relaxamento concentração-dependente em ambos os grupos, porém tanto $R_{\text{máx}}$ quanto pD_2 foram menores no grupo TBT ($R_{\text{máx}}$; CT, n=8: $92,9 \pm 1,9$ vs TBT, n=8: $77 \pm 5,18^*$ % de contração ao KCl, * $p < 0,05$ vs CT e pD_2 ; CT, n=8: $7,31 \pm 0,25$ vs TBT, n=8: $6,37 \pm 0,27^*$ $p < 0,05$ vs CT) (Figura 20).

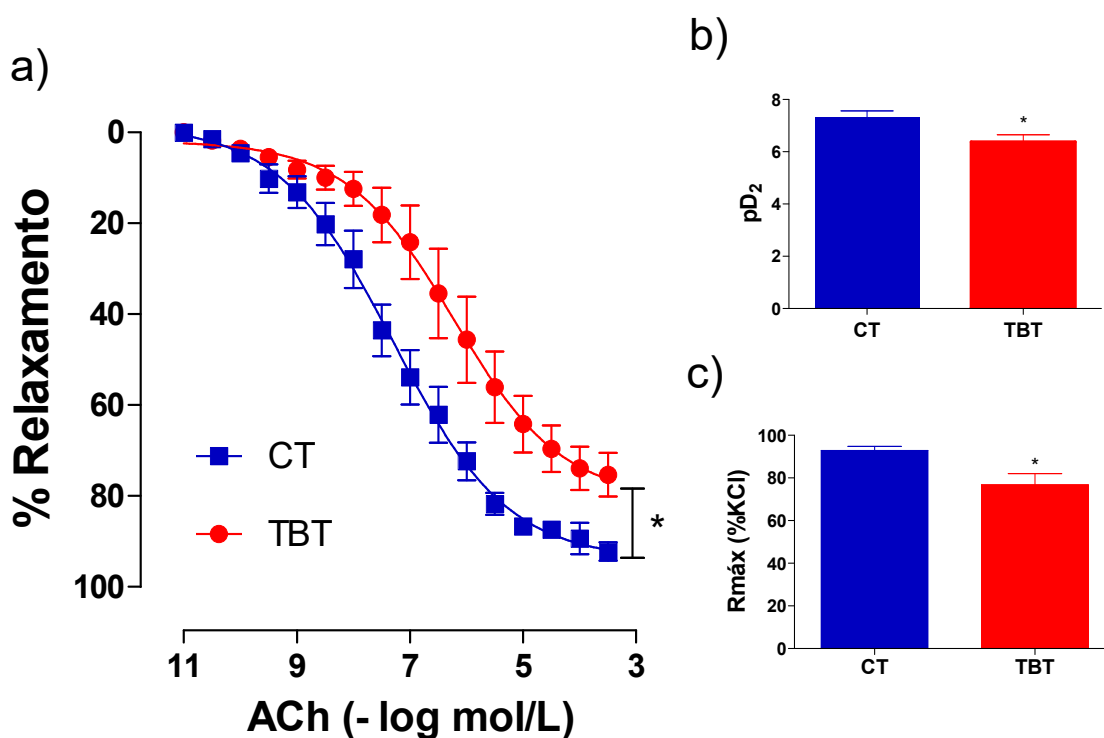


Figura 20: a) Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) para a em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle (CT, n=8) e Tributilestanho (TBT, n=8). b) Sensibilidade (pD_2), no qual representa 50% da contração máxima. c) Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Os dados são expressos em média \pm EPM. Teste t de *Student* não pareado para a comparação dos $R_{\text{máx}}$ e pD_2 ; ANOVA 2 vias, post hoc Bonferroni, quando comparadas as curvas de resposta a acetilcolina. * $p < 0,05$ vs CT;

6.8. Quantificação da produção de Espécies reativas de oxigênio (EROs) através da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE).

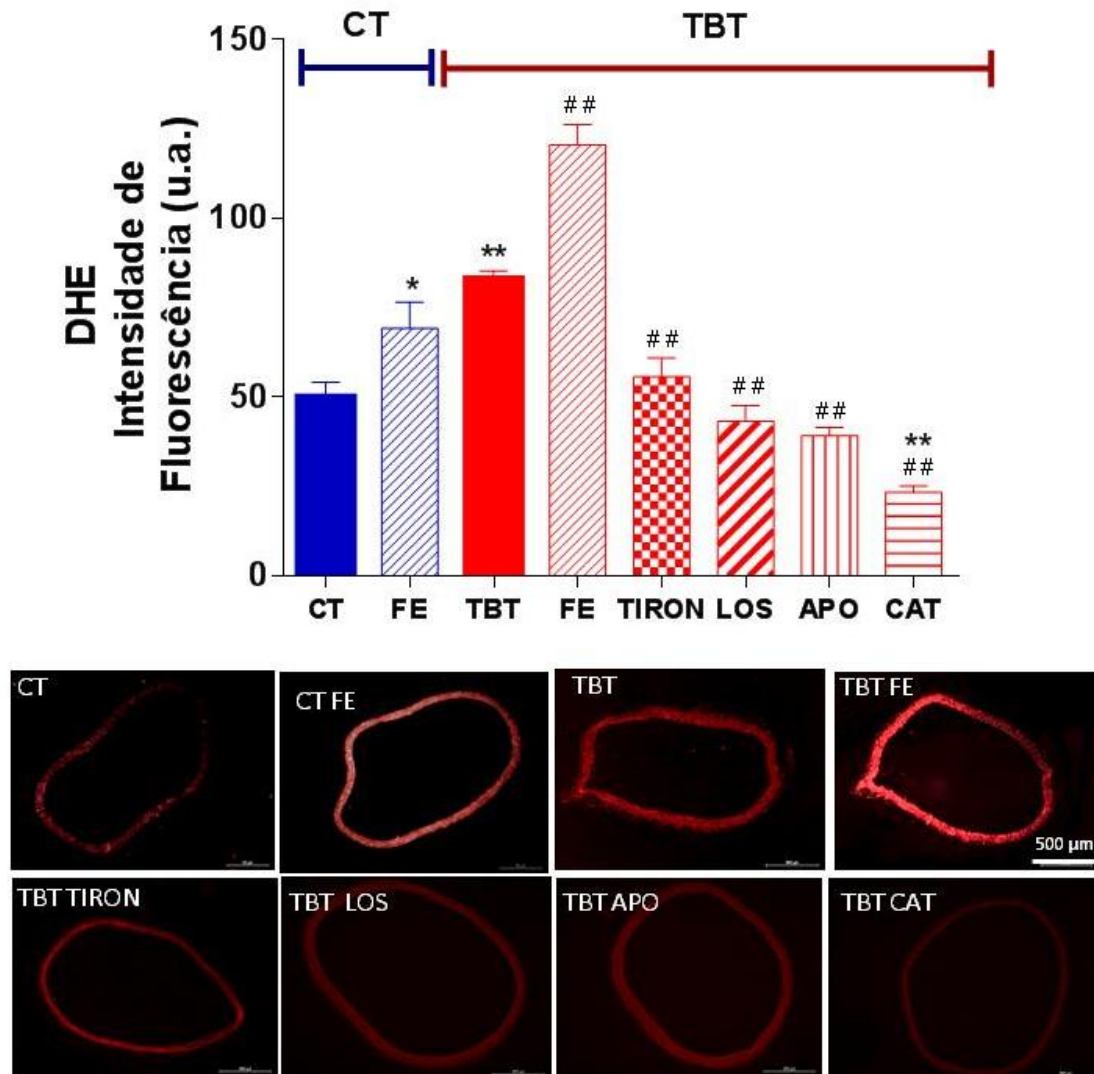


Figura 21: Avaliação da intensidade de fluorescência da produção de ânion superóxido (O_2^-), pela técnica do dihidroetídio (DHE) na aorta dos grupos: Controle (CT); Controle Fenilefrina (CT FE); Tributilestanho (TBT); Tributilestanho Fenilefrina (TBT FE); Tributilestanho Tiron (TBT TIRON); Tributilestanho Losartan (TBT LOS); Tributilestanho Apocinina (TBT APO); Tributilestanho Catalase (TBT CAT). Valores expressos em média \pm EPM; teste ANOVA uma via, post hoc Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs CT; ## $p < 0,01$ vs TBT. As imagens representativas foram fotografadas com em microscópio de fluorescência em aumento 5 X. A análise da fluorescência de cada imagem foi medida no aumento de 40 X.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos os efeitos vasculares 24 horas após exposição a uma única dose TBT 500 ng/kg, em ratas Wistar. O principal resultado encontrado foi o aumento da reatividade a fenilefrina e menor do relaxamento induzido por ACh, acompanhado de estresse oxidativo, que foi prevenido pelo uso de antioxidantes e do bloqueador do receptor de angiotensina II.

Os compostos organoestânicos, dentre eles o tributilestanho (TBT), são capazes de interferir diretamente em glândulas endócrinas e no controle neuro-hormonal (MARQUES; FARIA; DOS SANTOS, 2018). Existem indicações que o TBT atua diretamente na produção de EROs, o que poderia aumentar a resposta vasoconstritora e reduzir a resposta vasodilatadora.

A exposição prolongada ao TBT, por 15 dias, foi capaz de alterar a reatividade vascular em artéria coronária (DOS SANTOS et.al., 2012), em aorta isolada (RODRIGUES et.al., 2014; XIMENES et.al., 2017) e em artérias mesentéricas de ratas (RIBEIRO JUNIOR et.al., 2016). A exposição ao TBT em células troncos vasculares e endoteliais de mamíferos por 24 h (BOTELHO et.al., 2015) e 48 h (BERNARDINI et.al., 2016) alterou a estrutura, funcionalidade e a capacidade de diferenciação celular. O uso agudo de TBT em anel isolado de artéria umbilical humana induz relaxamento a serotonina e histamina (GLÓRIA et.al., 2018). Entretanto, após 24 h de exposição a 100 µM de TBT, os autores demonstraram prejuízo na contração a serotonina.

Solomon; Krishnamurty (1992) demonstraram que 1 h após exposição ao TBT, ocorreu inibição do relaxamento induzido pelo peptídeo natriurético atrial em anéis de aorta de ratos nas concentrações de 10^{-6} e 10^{-7} M.

No presente trabalho, foi encontrado que a exposição de ratas com TBT (500 ng/Kg), durante 24 horas, reduz o relaxamento dependente do endotélio, induzido pela ACh em anéis de aorta de ratas, sendo indicativo de disfunção vascular. Prejuízos na vasodilatação também já foram descritos anteriormente em ratos expostos ao TBT por um período mais prolongado. Dos Santos et.al., (2012),

encontraram alteração na vasodilatação coronariana, com desnudação da superfície endotelial, e um aumento na deposição de colágeno e do número de mastócitos de artérias coronárias de ratas, tratadas com TBT (100 ng/Kg), durante 15 dias, concluindo que a exposição ao TBT pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Em vasos de resistência, como artéria mesentérica de ratas, a exposição ao TBT (500 ng/kg), por 15 dias, não modificou o relaxamento dependente e independente do endotélio, porém, os autores mostraram alteração desse leito da resposta miogênica e rigidez (RIBEIRO JÚNIOR et.al., 2016).

Rodrigues et.al., (2014) demonstraram que a exposição ao TBT (100 ng/kg), por 15 dias, reduziu o relaxamento dependente e independente do endotélio, uma vez que a sensibilidade ao nitroprussiato de sódio e ACh estavam reduzidas. Ximenes et.al. (2017), utilizando concentrações maiores de TBT (500 ng/Kg), por 15 dias, também encontraram redução no relaxamento dependente e independente do endotélio, corroborando os dados encontrados no presente estudo.

Segundo Rodrigues et.al., (2014), a exposição ao TBT, por 15 dias, na concentração de 100 ng/kg, resultou na diminuição da reatividade vascular de anéis de aorta à felinefrina, com aumento da produção de EROs. Ximenes et.al. (2017), expuseram ratas a uma maior dose de TBT (500 ng/Kg), por 15 dias, encontraram aumento da resposta contrátil à felinefrina, e também aumento da produção de EROs. No presente estudo, as ratas foram tratadas com uma única dose de TBT 500 ng/Kg e 24 horas depois, os anéis isolados de aorta apresentaram aumento da resposta contrátil à felinefrina e de EROS.

O aumento da resposta contrátil vascular, encontrada na aorta dos animais tratados com TBT, pode depender tanto de mecanismos diretamente relacionados ao músculo liso quanto a fatores endoteliais. A integridade endotelial é fundamental na regulação do tono vascular, na estrutura dos vasos, na regulação do fluxo sanguíneo, além de estar envolvida em diversas doenças como trombose e aterosclerose (BATLOUNI, 2001). O TBT tem sido descrito capaz de modificar a integridade endotelial, principalmente por alterar a biodisponibilidade do NO.

Rodrigues et.al., (2014), expondo os animais ao TBT na concentração 100 ng/kg,e Ximenes et.al. (2017) tratando os animais com o TBT na concentração de 500 ng/kg, evidenciaram maior biodisponibilidade de NO na aorta de ratas tratadas com TBT, durante 15 dias. Ribeiro Júnior et. al.(2016), descreveram que artérias mesentéricas de ratas tratadas com TBT (500 ng/kg), por 15 dias, apresentaram redução da biodisponibilidade e da produção vascular de NO, possivelmente dependente da menor expressão de eNOS.

No presente estudo, a exposição por 24 horas ao TBT, na concentração de 500 ng/Kg, também promoveu uma menor biodisponibilidade de NO em anéis isolados de aorta. A redução de NO vascular poderia contribuir tanto para o menor relaxamento a ACh quanto a maior contração a fenilefrina encontrados no grupo TBT em relação ao grupo Controle. Sabe-se que a contração a fenilefrina é mediada pela sua ligação a receptores do tipo α -adrenérgico no músculo liso vascular, via elevação do segundo mensageiro, IP3 (inositol trifosfato) e DG (diacilglicerol). O NO, produzido pelo endotélio vascular, é capaz de se difundir para o músculo liso e contrabalancear a resposta de agentes vasoconstrictores, como os agonistas α -adrenérgicos, como a fenilefrina. Em situações de ausência, ou deficiência de NO, o balanço efetivo é desviado para uma maior contração mediada pela fenilefrina. Já o relaxamento a ACh, depende de sua ligação a receptores muscarínicos endoteliais (M) e da liberação de NO que atuará no músculo liso ativando a via do GMPc para produzir seu relaxamento. Assim, a menor biodisponibilidade de NO, poderia ser um dos fatores responsáveis pelo menor relaxamento a ACh nos anéis de aorta após a exposição ao TBT.

A menor biodisponibilidade do NO poderia ser decorrente do aumento na produção de EROs, ou mesmo da redução das enzimas e fatores antioxidantes, que reduzem as EROs. Alguns estudos demonstraram que a exposição ao TBT promove aumento das EROs, levando assim ao estresse oxidativo, o que gera danos oxidativos vascular, neural e endócrino (MITRA et.al., 2013; RODRIGUES et.al., 2014, PODRATZ et.al., 2015; XIMENES et.al., 2017).

As células possuem sistemas de defesas antioxidantes que reduzem ou neutralizam as EROs. Dentre estas defesas podemos citar as enzimas antioxidantes, como: a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. Quando a produção de

EROs ultrapassa as defesas antioxidantes, o estresse oxidativo instalado, pode modificar de maneira irreversível a estrutura de macromoléculas essenciais para o funcionamento celular, como o DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos o que poderia induzir aterogênese e ser um importante fator de doenças cardiovasculares.

No presente estudo, os animais do grupo TBT apresentaram aumento na produção das EROs. A participação das EROs sobre a reatividade a fenilefrina nos anéis de aorta foi avaliada por meio da incubação com agentes antioxidantes e bloqueador do receptor AT₁. Dentre eles, foi utilizado a Apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, o Tiron, antioxidante responsável pela varredura dos ânions superóxido, a Catalase, varredor de peróxido de hidrogênio, e o Losartan, inibidor seletivo do receptor AT₁. Esses agentes diminuíram o aumento da resposta vasoconstrictora a fenilefrina no grupo TBT. Os resultados sugerem que O₂⁻, H₂O₂, e a angiotensina II, estão envolvidos nas alterações vasculares e na disfunção endotelial promovidas pela exposição ao TBT. Em várias doenças cardiovasculares tais como: aterosclerose, hipercolesterolemia, hipertensão e insuficiência cardíaca, ocorre disfunção endotelial associada com aumento da produção das EROs. (BATLOUNI, 2001; ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004; RABÊLO et.al., 2009; LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014)

Um dos maiores produtores de EROs, para o sistema vascular, é o complexo enzimático da NADPH oxidase. Em condições em que o aumento da atividade da NADPH oxidase, e consequente da produção de EROs, supera a produção dos antioxidantes, pode haver estresse oxidativo celular. Além disso, o aumento da atividade da NADPH oxidase reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico, o qual é importante para manutenção da função vascular normal (RABÊLO et.al., 2009).

Rodrigues et.al., (2014), e Ximenes et.al., (2017), demonstraram que a exposição ao TBT 100 ng/kg e 500 ng/Kg respectivamente, durante 15 dias, foi capaz de aumentar as EROS na aorta. Os autores mostraram que o uso de antioxidantes foi capaz de reduzir o aumento da reatividade a fenilefrina na aorta induzida pelo TBT. Estes dados corroboram os achados do presente estudo. Tang et.al., (2007) demonstraram que a ação de EROs nas células endoteliais de aorta podem promover vasoconstrição e disfunção endotelial.

Além disso, segundo nossos resultados, houve uma redução da reatividade vascular à felinefrina após a incubação com Losartan (bloqueador AT1) nos anéis de aorta de ratas expostas ao TBT, sugerindo que a angiotensina II (ANG II) está participando no aumento da atividade contrátil. A angiotensina II atua via receptor AT1, estimulando a NADPH oxidase e que gera EROs (TOUYZ; TABET; SCHIFFRIN, 2003). Ribeiro Júnior et.al., (2016) encontraram aumento da expressão protéica de marcadores como NADPH oxidase e do receptor AT1 em artérias mesentéricas de ratas tratadas com TBT (500 ng/Kg), durante 15 dias.

A disfunção da reatividade vascular induzida por metais já tem sido descrita na literatura. A exposição aguda a metais pesados é capaz de causar prejuízo na reatividade vascular. Lemos et.al., (2012) demonstraram que anéis de aorta incubados com cloreto de mercúrio (HgCl_2 , 6 nM por 45 min), apresentam aumento da resposta vasoconstritora a fenilefrina e das EROs. Os autores demonstraram que a menor resposta vasoconstrictora ao losartan e aumento da expressão do receptor AT_1 no grupo exposto ao HgCl_2 , sugerindo que a angiotensina II participa do aumento da resposta contrátil vascular.

Nunes et.al., (2018) incubaram anéis de aorta de ratos com cobre (Cu), 10 μg / mL, por 1h, e encontraram redução na reatividade vascular mediada por fenilefrina correlacionado com o aumento da produção de óxido nítrico (NO). Os autores encontraram níveis elevados de peróxido de hidrogênio vascular.

Vassallo et.al., (2017), demonstraram que a incubação aguda com cádmio (45 min, 10 μM), reduzir a atividade da Na^+ / K^+ -ATPase mas não interfere nos canais de potássio ativados por cálcio e nos canais de cálcio voltagem dependentes.

Schmidt et.al, (2016) demonstraram que ratos expostos a uma única dose de alumínio (AlCl_3 , 100 mg/kg, *ip*) apresentaram redução da reatividade vascular, aumento das EROs, aumento da produção de NOS. Omanwar et.al., (2013), demonstraram que ratos expostos por 24 horas a uma única dose de cloreto de mercúrio, 5 mg / kg, apresentaram estresse oxidativo, aumento no relaxamento vascular da ACh sem alteração na pressão arterial sistólica.

No presente estudo, a produção vascular de O_2^- foi identificada através do método do DHE. A intensidade de fluorescência foi maior nos anéis de aorta do grupo TBT

quando comparada ao grupo Controle. Na presença de fenilefrina essa intensidade foi maior em ambos os grupos e normalizada após incubação com os antioxidantes e losartan. Este resultado reforça os achados anteriores que sugerem que a exposição a uma única dose de TBT aumenta a produção de EROS na aorta.

A relevância clínica do presente estudo está no fato de uma única exposição ao TBT induziu alterações vasculares descritas em doenças cardiovasculares relacionadas à disfunção endotelial, atribuída à menor biodisponibilidade de NO e estresse oxidativo. Sendo assim, podemos considerar que a exposição ao TBT, mesmo por um curto período, possui um potencial deletério sobre a função vascular.

8. CONCLUSÃO

A exposição a uma única dose de TBT 500 ng/kg, por 24 horas foi capaz de causar disfunção endotelial e induzir aumento da resposta vasoconstrictora e redução da resposta vasodilatadora, isso parece ser mediado pelo estresse oxidativo vascular.

9. REFERÊNCIAS

- ADEEKO, A. et.al. Effects of in Utero Tributyltin Chloride Exposure in the Rat on Pregnancy Outcome. **Toxicological Sciences**, v. 74, p. 407–415, 2003.
- DE ARAÚJO, JFP. et.al. The Obesogen Tributyltin Induces Abnormal Ovarian Adipogenesis in Adult Female Rats. **Toxicology Letters**, v. 295, p.99-114, 2018.
- ALZIEU C. Environmental impact of TBT: the French experience. **The Science of the Total Environment**, v. 258 (1-2), p. 99-102, 2000.
- ANGELI, J. K. et.al. Gadolinium increases the vascular reactivity of rat aortic rings. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, p. 445-452, 2011.
- BARNES, J.M.; STONERT, H.B. The Toxicology os tin compounds . **Toxicology Research Unit**, v.11, p. 211-231, 1959.
- BERNARDINI, C. et.al. Deleterious effects of tributyltin on porcine vascular stem cells physiology. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology**, vs. 185–186, p. 38-44, 2016.
- BERTULOSO, B.D. et.al. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology Letters**, v. 235, p. 45–59, 2015.
- BRASIL. NORMAM-23/DPC (2007). **Normas da autoridade marítima para o controle de sistemas antiincrustantes danosos em embarcações**. Marinha do Brasil: Diretoria de portos e costas, 2007 - <https://www.dpc.mar.mil.br/sites/default/files/normam23.pdf>
- BOTELHO, G.A et.al.- Effect of tributyltin on mammalian endothelial cell integrity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology Pharmacology**, vs. 176–177, p. 79–86, 2015.
- BATLOUNI M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v., 8, p. 328-38, 2001.
- CAT N.D.A et.al. Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. **Antioxidantes Redox Signaling**, v. 19, n. 10, p. 1110–1120, 2013.

CASTRO, I.B.; PERINA, F.C.; FILLMANN, G. Organotin contamination in South American coastal areas. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 184, p. 1781–1799, 2012.

CAO, D. et.al. Organotin pollution in China: An overview of the current state and potential health risk. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p.16-24,2009.

COSTA, M.B. et.al. Differential organotin sensitivity in two *Leucozonia* species from a ship traffic area in southeastern Brazil. **Marine Biology Research**, v. 10:7, p. 712-724, 2014.

CEULEMANS, M.; SLAETS, S.; ADAMS, F. Speciation of organotin in environmental sediment samples. **Talanta**, v. 46, p. 395-405, 1998.

DE CARVALHO OLIVEIRA, R.; SANTELLI, R.E. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: a review. **Talanta**. v. 82, p. 9–24, 2010.

DIAS, F.M.V. **Atividade Funcional da Na^+ / K^+ ATPase sensível à oubaína em aortas de ratas com e sem sinais de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

DOS SANTOS D.M. **Compostos organoestânicos no material particulado em suspensão e sedimentos superficiais no eixo leste oeste do complexo estuarino de Paranaguá**. Dissertação (Mestrado em Biogeoquímica Marinha) - Sistemas Costeiros e Oceânicos, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

DOS SANTOS, R.L et.al. Tributyltin Impairs the Coronary Vasodilation Induced by 17β -Estradiol in Isolated Rat Heart. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, v. 75, n. 16-17, p. 948-959, 2014.

DREXLER, H.; HORNIG, B. Endothelial Dysfunction: a Novel Therapeutic Target Endothelial Dysfunction in Human Disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, p. 51–60, 1999. ENDEMANN, D.H.; SCHIFFRIN, E.L. Endothelial Dysfunction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, p. 1983–1992, 2004.

FERNANDEZ, M.A. et.al. Imposed and surface sediments speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 59, p. 435–52, 2005.

FERREIRA, M. et.al. In Vitro Approaches To Evaluate Toxicity Induced by Organotin Compounds Tributyltin (TBT), Dibutyltin (DBT), and Monobutyltin (MBT) in Neuroblastoma Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4195-4203, 2013.

GADD, G.M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. **Science of the Total Environment**, v. 258, p. 119–27, 2000.

GUI-BIN J.; QUN-FANG, Z.; BIN, H. Speciation of Organotin Compounds, Total Tin, and Major Trace Metal Elements in Poisoned Human Organs by Gas Chromatography- Mass Spectrometry. *Environment Science of Technology*, v. 34, p. 2697-2702, 2000.

GLÓRIA, S. et.al. Tributyltin role on the serotonin and histamine receptors in human umbilical artery. **Toxicology In Vitro**, v. 50, p. 210-21, 2018.

GODOI, A.F.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 708-716, 2003.

GODOI, A. F. L.; MONTONE R. C.; SANTIAGO-SILVA M. Determination of butyltin compounds in surface sediments from the Sao Paulo State coast (Brazil) by gas chromatography-pulsed flame photometric detection. **Journal of Chromatography**, v. 985, p. 205– 210, 2003b

SNOEIJ N.J; PENNINKS A.H.; SEINEN W. Biological Activity of Organotin Compounds-An Overview. **Environmental research**, v. 44, p. 335-353, 1987.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment — an overview, **Applied Geochemistry**, v. 16, p. 719–743, 2001.

IPCS. Tributyltin compounds. Geneva: WHO. (International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 116), 1990.

IPCS. Tributyltin Oxide. Geneva: **WHO**. (International Programme on Chemical Safety. Concise International Chemical Assessment Document 14), 1999.

WHO. Toxicological review tributyltin oxide [Online] 1997 <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0349tr.pdf> (accessed May 2018).

LEE, C.C.; HSIEH, C.Y.; TIEN, C.J. Factors influencing organotin distribution in different marine environmental compartments, and their potential health risk. **Chemosphere**, v. 65, p. 547–559, 2006.

LEMOS, N.B. et.al. Low Mercury Concentration Produces Vasoconstriction, Decreases Nitric Oxide Bioavailability and Increases Oxidative Stress in Rat Conductance Artery. **PLOS One**, v. 7, p. 1-12, 2012.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular Oxidative Stress, Nitric Oxide and Atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, p. 208-219, 2014.

LIU, Z.; KHALIL, R.A. Evolving Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction Highlight Key Targets in Vascular Disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 153, p. 91-122, 2018.

MARQUES, V.B.; FARIA, R.A.; DOS SANTOS, L. Overview of the Pathophysiological Implications of Organotins on the Endocrine System. **Frontiers Endocrinology**, v. 9, p. 1-8, 2018.

MARTINS, T.L.; VARGAS, V.M.F. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 1, p. 01-11, 2013.

MEHTA, P.K.; GRIENDLING, K.K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, p. 82-97, 2007.;

MITRA, S. et.al. Comparative toxicity of low dose tributyltin chloride on serum, liver, lung and kidney following subchronic exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 335-343, 2013.

NENG, N.R.; SANTALLA, R.P.; NOGUEIRA, J.M. Determination of tributyltin in environmental water matrices using stir bar sorptive extraction with in-situ

derivatisation and large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. Talanta, v. 126, p. 8-11, 2014. NICKLIN S.; ROBSON, M.W. Organotins: toxicology and biological effects. **Mammalian toxicology and biological effects of organotins.** v.2, p. 487-511, 1988. NGUYEN, G. et.al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to rennin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 1417-1427, 2002.

NUNES, K.Z. et.al. Acute copper overload induces vascular dysfunction in aortic rings due to endothelial oxidative stress and increased nitric oxide production. **Journal os Toxicology and Environmental Health, part A**, v. 81, p. 218-228, 2018.

OGATA, R. et.al. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats., **Journal of Toxicology Environmental Health**, v. 63, p. 127–44, 2001.

OMAE, I. Chemistry and Fate of Organotin Antifouling Biocides in the Environment. **pHandbook of Environmental Chemistry**,, v. 50, p. 17-50, 2006

OMANWAR, S. et.al. Modulation of Vasodilatador Response via the Nitric Oxide Pathway after Acute Methyl Mercury Chloride Expresure in Rat. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-8, 2013.

PODRATZ, P.L. et.al. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive Toxicology**, v. 57, p. 29–42, 2015.

RAJAMANI,U. et.al. Endocrine disruptors induce perturbations in endoplasmic reticulum and mitochondria of human pluripotent stem cell derivatives. **NATURE COMMUNICATIONS**, v. 8, p. 1-15, 2017. RIBEIRO JÚNIOR, R.F. et.al. Tributyltin chloride increases phenylephrine-induced contraction and vascular stiffness in mesenteric resistance arteries from female rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 295, p. 26–36, 2016.

RODRIGUES, S. M. L. et.al. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. **Toxicology Letters**, v. 225, n. 3, p. 378–385, 2014.

RONCONI, K. S; STEFANON, I; RIBEIRO JUNIOR, R.F. Tributyltin and Vascular Dysfunction: The Role of Oxidative Stress. **Frontiers Endocrinology**, v. 9, n. 354, 2018.

SARRADIN, P.M. et.al. Long term behaviour and degradation kinetics of tributyltin in a marina sediment. **Science Total Environment**, v.1 70, p. 59–70, 1995.

STAREK, A. TRIBUTYLTIN COMPOUNDS – THE SUBSTANCES NOXIOUS TO HEALTH. **ROCZNICK PZH**, v. 60, n. 1, p. 3 - 11, 2009.

SOLOMON, R.; KRISHNAMURTY, V. The effect of tributyltin chloride on vascular responses to atrial natriuretic peptide. **Toxicology**, v. 76, p. 39-47, 1992.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiology Reviews**, v. 83, p. 1325–1358, 2003.

SCHMIDT, P.M. et.al. Aluminum exposure for one hour decrease vascular reactivity in conductance and resistance arteries in rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 313, p. 109-118, 2016.

TBT-based antifouling paints remain on sale. **Marine Pollution Bulletin**. v.88 p. 398–400, 2014. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.08.041>.

TANG, E. et.al. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 1, p. 15–23, 2007.

TOUYZ, R.M.; TABET, F.; SCHIFFRIN, E.L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. **Clinical Experimental Pharmacology Physiology**, v. 30, n. 11, p. 860- 866, 2003.

VANHOUTTE, P.M. et.al.. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. **Acta Physiology**, v.219, p. 1-75, 2016.

VASSALLO, D.V. et.al Preliminary studies os Acute Cadmium Administration Effects on the Calcium-Activated Potassium (SKCa AND BKCa) Channels and Na^+/K^+ -ATPase in Isolated Aortic Rings of Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 183, p. 325-334, 2017.

WAMHOFF, B.R; BOWLES, D.H; OWENSG, K. Excitation-Transcription Coupling in Arterial Smooth Muscle. **Circulation Research**, v.98, p. 868 -878, 2006.

WEBB R.C. Smooth Muscle Contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p.201-206, 2003.

WOODRUM, D.A.; BROPHY, C.M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, p.135–143, 2001.

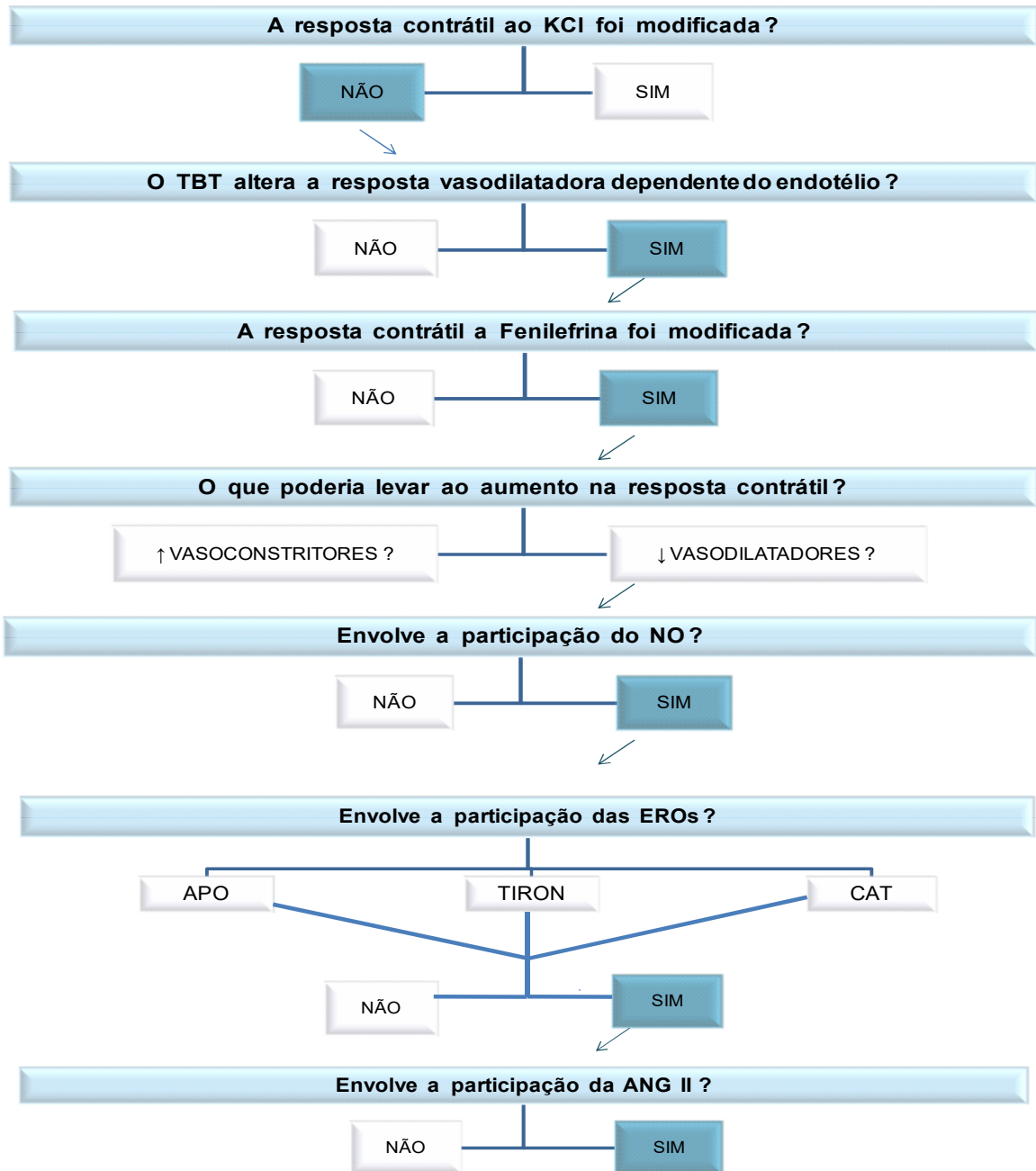
Wynne, B.M.; Chiao, C.W.; Webb, R.C. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. **Journal of American of Society of Hypertension**, v. 3, n. 2, p. 84–95, 2009.

XIMENES, C.F. **et.al.** Tributyltin chloride disrupts aortic vascular reactivity and increases reactive oxygen species production in female rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 31, p. 509-520, 2017. Yamanda, J. **et.al.** Low-concentration tributyltin pertubs inhibitory synaptogenesis and induces neuronal death in immature but not mature neurons. **Toxicology Letters**, v. 192, p. 282-288, 2010.

Yamanda, J. **et.al.** Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Scientific Reports**, v. 8, p.1-10, 2018.

APÊNDICE

Uma única dose de TBT (500ng/Kg) promoveria alterações na reatividade vascular após 24 horas?



Uma única dose de TBT (500ng/Kg) promoveria alterações na reatividade vascular após 24 horas?

